



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CIBUS. FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LA FOSFORILACIÓN DE LA  
PROTIMOSINA  $\alpha$  EN CÉLULAS EN PROLIFERACIÓN**

DESCUBRIMIENTO DE LA BIFUNCIONALIDAD ENZIMÁTICA DE LA  
ISOENZIMA M2 DE LA PIRUVATO QUINASA

Memoria que, para optar al grado de Doctor en Bioquímica, presenta

**David Moreira Álvarez**

Santiago de Compostela, marzo de 2012





Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

CIBUS. Facultad de Biología

Universidad de Santiago de Compostela

**Manuel Freire Rama**, catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela, y **Cristina Díaz-Jullien**, profesora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela,

CERTIFICAN:

Que la memoria adjunta, titulada **“ESTUDIO DE LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTIMOSINA  $\alpha$  EN CÉLULAS EN PROLIFERACIÓN: Descubrimiento de la bifuncionalidad enzimática de la isoforma M2 de la piruvato quinasa”**, presentada por el licenciado en Biología Molecular y Biotecnología David Moreira Álvarez para optar al grado de Doctor en Bioquímica, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela y, considerándola concluida, autorizamos su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Fdo. Manuel Freire Rama

Fdo. Cristina Díaz-Jullien

Fdo. David Moreira Álvarez

Santiago de Compostela, 7 de marzo de 2012





El trabajo que ha dado lugar a la memoria aquí presentada ha sido financiado por los proyectos XUGA: PGIDT04CXIB20001PR de la Xunta de Galicia y DGU 2004-02523 del Ministerio de Educación y Ciencia, cuyo investigador principal es el profesor Manuel Freire Rama.

Asimismo, el trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en su totalidad en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela, con ayuda de una Beca de Tercer Ciclo de la Xunta de Galicia y un contrato predoctoral de formación de doctores en organismos públicos de investigación de la Comunidad Autónoma de Galicia del programa María Barbeito 2008 (Programa de Recursos Humanos del Plan Gallego de Investigación, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2006-2010).



# **AGRADECIMIENTOS**



# AGRADECIMIENTOS

A mi director, el profesor Manuel Freire Rama, por acogerme en su grupo de investigación y permitirme trabajar en su proyecto. Agradezco especialmente su infatigable capacidad de enseñanza y motivación, su comprensión y, por supuesto, su intensa pasión por la ciencia y su inagotable vitalidad.

*“El hombre es verdaderamente grande sólo cuando obra a impulso de las pasiones.”*

Benjamin Disraeli

A mi directora, la profesora Cristina Díaz-Jullien, por su confianza y apoyo. Sus conocimientos, consejos y aportaciones han sido indispensables en esta etapa personal. Lo conseguido habría sido imposible sin su participación.

*“La inteligencia consiste no sólo en el conocimiento, sino también en la destreza de aplicar los conocimientos en la práctica”*

Aristóteles

A Willy y Conchita, por tratarme como uno más, por soportar y resolver mis dudas, por su compañerismo y sinceridad...y por convertir un laboratorio de bioquímica en algo más que un laboratorio.

*“Duda siempre de ti mismo, hasta que los datos no dejen lugar a dudas”*

Louis Pasteur

A Primitivo, mi profesor de bioquímica hace ya bastantes años, por servirme de guía en los inicios de mi actividad investigadora. Su experiencia, implicación y preocupación han sido muy importantes para mí.

*“La experiencia no consiste en el número de cosas que se han visto, sino en el número de cosas que se han reflexionado.”*

José María de Pereda

## Agradecimientos

---

A Pablo y Juan, por su constante empatía, amabilidad y cercanía. Las dificultades diarias y los problemas inherentes a este tipo de trabajo se volvieron mucho más llevaderos con vuestras conversaciones y ayuda. Me he divertido mucho con vosotros.

*“La función intelectual de las dificultades es la de conducir a hombres y mujeres a pensar.”*

John Dewey

A Pablo, Jacob, Jesús, Brais, Boris, Ángela, María, Vanesa, Joana, Rafa, César, Sofía, Íñigo, Marta, Juanjo, Haxel y aquellas personas con las que he tenido la suerte de compartir esta etapa de mi vida. Dicen que mucha gente no vive, solo existe, sin más...yo he vivido con vosotros, cada día, cada minuto...cada frustración, cada error, cada alegría, cada decisión... os lo agradezco. Y Greebo también.

*“La soledad se admira y desea cuando no se sufre, pero la necesidad humana de compartir cosas es evidente.”*

Carmen Martín Gaité

A Nadia y Ana, porque siempre es sorprendente cómo pueden terminar a veces las cosas. Sonríe al pensarlo.

*“La vida no se ha hecho para comprenderla, sino para vivirla.”*

Jorge Ruiz de Santayana

A Vicente, por tu optimismo, tus ideas, nuestras conversaciones y todos los momentos profesionales y personales que hemos vivido. Por tener razón. Y por tu amistad.

*“La potencia intelectual de un hombre se mide por la dosis de humor que es capaz de utilizar.”*

Friedrich Nietzsche

A Eloy, por innumerables motivos. Un biólogo al que le debo mucho. Un buen amigo. Mucha suerte. Ojalá hubiese más personas como tú.

*“Los ideales que han iluminado mi camino y una y otra vez me han infundido valor para enfrentarme a la vida. Han sido la bondad, la belleza y la verdad.”*

Albert Einstein

## Agradecimientos

---

A Pitu, Pollo, Delfi, Manolo, Nené, Juan, Iván Manuel e Iván, por estar en el lugar de siempre, por seguir acordándoos de mí...porque cada uno de vosotros ha participado de una manera u otra en esto. Por todos estos años. Porque no sería lo mismo.

*"La amistad no tiene un valor de supervivencia, sino más bien es una de las cosas que da valor a la supervivencia."*

Clive Staples Lewis

A Silvia, por haberme dado todo lo que la ciencia no investiga. Por una canción de Coque Malla. Por un discurso. Por no terminar las frases. Por mirar por la ventana. Por un dibujo. Por un contrato. Por unas postales. Por insistir. Para siempre.

*"Sólo lo diré una vez. No lo había dicho nunca antes, pero esta clase de certeza solo se presenta una vez en la vida".*

Clint Eastwood

A mis hermanas, por todo lo que hemos superado juntos. Por su fuerza. Y por nuestra vida.

*"A veces podemos pasarnos años sin vivir en absoluto, y de pronto toda nuestra vida se concentra en un solo instante."*

Oscar Wilde

Y sobre todo, a mi madre. Resulta una ironía que la persona que más difícilmente comprenda lo detallado en estas páginas sea la principal y más importante responsable de ello. Y de todo lo demás. Gracias por la vida que me has dado. Muchísimas gracias.

*"Alégrate de la vida porque ella te da la oportunidad de amar, de trabajar, de jugar y de mirar a las estrellas."*

Henry Van Dike

## MUCHAS GRACIAS A TODOS

*"Tienes lo mismo que todo el mundo; toda una vida."*

Neil Gaiman





*A mi madre*



# ÍNDICE



# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>i</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
1. LAS TIMOSINAS.....	5
2. LAS TIMOSINAS $\alpha$ Y SU PRECURSOR.....	7
3. ESTRUCTURA DE LA PROTIMOSINA $\alpha$ Y SU EXPRESIÓN EN LOS DIFERENTES TEJIDOS.....	9
4. GENES DE LA PROTIMOSINA $\alpha$ .....	15
5. CONCENTRACIÓN Y DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE LA PROTIMOSINA $\alpha$ .....	17
6. EVOLUCIÓN POST-BIOSÍNTESIS Y FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LA PROTIMOSINA $\alpha$ .....	20
6.1. PROTIMOSINA $\alpha$ Y PROLIFERACIÓN CELULAR.....	21
6.2. PROTIMOSINA $\alpha$ Y ACTIVIDAD REMODELADORA DE LA CROMATINA.....	24
6.3. PROTIMOSINA $\alpha$ Y APOPTOSIS.....	34
6.4. PROTIMOSINA $\alpha$ Y ESTRÉS OXIDATIVO.....	43
6.5. PROTEOLISIS DE LA PROTIMOSINA $\alpha$ .....	44
6.6. LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTIMOSINA $\alpha$ .....	47
<b>II. CONOCIMIENTO ACTUAL DE LA BIOLOGÍA DE LA PROTIMOSINA <math>\alpha</math> Y OBJETIVOS.....</b>	<b>59</b>

<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>69</b>
<b>1. MATERIAL BIOLÓGICO.....</b>	<b>69</b>
<b>2. MATERIAL NO BIOLÓGICO.....</b>	<b>73</b>
<b>3. MÉTODOS.....</b>	<b>77</b>
3.1. CULTIVOS CELULARES.....	77
3.2. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES.....	79
3.3. ENSAYOS DE ACTIVIDAD QUINASA PROT $\alpha$ K.....	80
3.4. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD PROT $\alpha$ K.....	81
3.5. ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	83
3.6. PURIFICACIÓN DE LA ISOFORMA M2-PK CON ACTIVIDAD PROT $\alpha$ K Y ACTIVIDAD PK EN CÉLULAS NC37.....	83
3.7. ENSAYOS DE ACTIVIDAD PK .....	84
3.8. VECTORES DE EXPRESIÓN DE LA PROT $\alpha$ Y TRANSFECCIÓN EN CÉLULAS 293T Y HELA.....	85
3.9. ENSAYOS INMUNOLÓGICOS.....	90
3.10. ANÁLISIS DE FOSFOAMINOÁCIDOS.....	95
3.11. ENSAYOS DE DESFOSFORILACIÓN.....	96
3.12. FILTRACIÓN EN GEL.....	96
3.13. ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA Y MICROSCOPÍA CONFOCAL.....	97
3.14. ENSAYOS DE ACTIVIDAD APOPTÓTICA.....	98
 <b>IV. RESULTADOS</b>	
<b>1. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL         DE LA ACTIVIDAD PROT<math>\alpha</math>K EN LINFOCITOS NC37.....</b>	<b>105</b>
<b>2. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS ACTIVIDADES         PROT<math>\alpha</math>K Y PK EN LINFOCITOS HUMANOS.....</b>	<b>108</b>

3. ESTUDIO DE LA BIFUNCIONALIDAD DE LA ISOFORMA M2 DE LA PK.....	120
4. INVESTIGACIÓN DEL COMPORTAMIENTO CELULAR DE LA PROT $\alpha$ EN RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD PROT $\alpha$ K Y LA PROTEÍNA M2.....	128
5. ESTUDIO PRELIMINAR DEL EFECTO BIOLÓGICO DE LA FOSFORILACIÓN DE LA PROT $\alpha$ .....	135
 V. DISCUSIÓN.....	 145
VI. CONCLUSIONES.....	159
VII. ANEXO.....	163
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	169
PUBLICACIONES	





## **ABREVIATURAS**



# ABREVIATURAS

**a.a.:** Aminoácido

**Apaf-1:** Factor 1 de activación de proteasas apoptóticas

**Asn:** Asparagina

**ATP:** Adenosín trifosfato

**Bax:** Proteína X asociada a Bcl-2

**Bcl:** Proto-oncogen de "linfoma de células B"

**BSA:** Seroalbúmina bovina

**CBP:** Proteína de unión a CREB (*CREB binding protein*)

**Cdc:** Ciclina (Ciclo de división celular)

**Cdk:** Quinasa dependiente de ciclina (*Cyclin dependent kinase*)

**cDNA:** DNA complementario

**CK-2:** Caseína quinasa 2 (*Casein kinase 2*)

**ConA:** Concanavalina A

**c.p.m.:** Cuentas por minuto

**DAPI:** 4',6-diamino-fenilindol

**DMEM:** Medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco

**DMP:** Dimetilpimelimidato

**DMSO:** Dimetil sulfóxido

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**DTT:** Ditiotreitól

**EBNA3C:** Antígeno nuclear 3C del virus Epstein-Barr

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetracético

**EGTA:** Ácido etilenglicoltetracético

**FBP:** Fructosa 1,6-bisfosfato

**FBS:** Suero fetal bovino

**F45 SA:** Fraccionado 45% sulfato amónico

**F75 SA:** Fraccionado 75% sulfato amónico

**Glu:** Glutamato

**HAT:** Acetiltransferasa de histonas

**HEPES:** Ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2'-etanesulfónico

**HIF-1:** Factor **1** inducible por **hipoxia**

**HMT:** Metiltransferasa de **histonas**

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución (*High performance liquid chromatography*)

**HRE:** Elementos de respuesta a **hipoxia**

**HRP:** Peroxidasa de rábano (*Horseradish peroxidase*)

**IAPs:** Proteínas inhibidoras de la apoptosis

**IFN:** Interferón

**Ig:** Inmunoglobulina

**IL:** Interleuquina

**INHAT:** Complejo inhibidor de acetiltransferasas de **histonas**

**IP:** Inmunoprecipitación

**kb:** kilobase

**kDa:** kilodalton

**LB:** Medio de cultivo Luria-Bertani

**LDH:** Lactato deshidrogenasa

**MAP:** Proteínas activadas por mitógenos (*Mitogen-activated proteins*)

**MHC:** Complejo principal de histocompatibilidad (*Major histocompatibility complex*)

**mRNA:** RNA mensajero

**NADH:** Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida)

**NP-40:** Nonidet **P-40**

**NF- $\kappa$ B:** Factor nuclear  $\kappa$ **B**

**Oct:** Factor de transcripción de unión al **octámero**

**PAGE:** Electroforesis en gel de **poliacrilamida**

**PBS:** Tampón fosfato salino (*Phosphate buffered saline*)

**PCNA:** Antígeno nuclear de células en **proliferación**

**PEP:** Fosfoenolpiruvato

**pI:** punto isoeléctrico

**PK:** Piruvato quinasa (*Pyruvate kinase*)

**PKA:** Proteína quinasa A (*Protein kinase A*)

**PKC:** Proteína quinasa C (*Protein kinase C*)

**PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

**ProTα:** Protimosina α

**ProTα T7A:** Protimosina α mutada en posición 7 (treonina por alanina)

**ProTαK:** Proteína quinasa de la ProTα (*ProTα kinase*)

**PVDF:** Polifluoruro de vinilideno

**Raf:** Factor activado por ras

**RNA:** Ácido ribonucleico

**RNAi:** RNA de interferencia

**RPMI:** Medio *Roswell Park Memorial Institute*

**SA:** Sulfato amónico

**SD:** Desviación estándar (*Standard deviation*)

**SDS:** Dodecilsulfato sódico

**Ser:** serina

**siRNA:** Moléculas pequeñas de RNA de interferencia (*small interfering RNA*)

**SMAC:** Segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria

**STATs:** Proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción (*signal transducers and activators of transcription*)

**T<sub>3</sub>:** 3, 3', 5-triiodo-L-tironina

**TAE:** Tampón tris acetato EDTA

**Tα<sub>1</sub>:** Timosina α<sub>1</sub>

**Tα<sub>11</sub>:** Timosina α<sub>11</sub>

**TBS:** Tampón tris salino (*Tris-buffered saline*)

**TF5:** Fracción de timosina 5

**Thr:** Treonina (*threonine*)

**TNF:** Factor de necrosis tumoral

**tProTα:** ProTα truncada

**WB:** Análisis *Western blot*



# INTRODUCCIÓN





## I. INTRODUCCIÓN

1. LAS TIMOSINAS.....	5
2. LAS TIMOSINAS $\alpha$ Y SU PRECURSOR.....	7
3. ESTRUCTURA DE LA PROTIMOSINA $\alpha$ Y SU EXPRESIÓN EN LOS DIFERENTES TEJIDOS.....	9
4. GENES DE LA PROTIMOSINA $\alpha$ .....	15
5. CONCENTRACIÓN Y DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE LA PROTIMOSINA $\alpha$ .....	17
6. EVOLUCIÓN POST-BIOSÍNTESIS Y FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LA PROTIMOSINA $\alpha$ .....	20
6.1. PROTIMOSINA $\alpha$ Y PROLIFERACIÓN CELULAR.....	21
6.2. PROTIMOSINA $\alpha$ Y ACTIVIDAD REMODELADORA DE LA CROMATINA.....	24
i. Interacción de la protimosina $\alpha$ con las histonas.....	24
ii. Interacción de la protimosina $\alpha$ con la proteína de unión a CREP (CBP) y potenciación de la transcripción.....	29
iii. Interacción de la protimosina $\alpha$ con la acetiltransferasa de histonas p300.....	30
iv. Interacción de la protimosina $\alpha$ con el represor del receptor de estrógeno.....	31
v. Asociación de la protimosina $\alpha$ con la oncoproteína SET e implicación en la descondensación de la cromatina.....	31
vi. Interacción de la protimosina $\alpha$ con el transductor de la señal y activador de la transcripción 3 (STAT3).....	32
vii. Interacción de la protimosina $\alpha$ con proteínas de la replicación celular.....	33
viii. Protimosina $\alpha$ y tumorigénesis.....	33

6.3.	PROTIMOSINA $\alpha$ Y APOPTOSIS.....	34
i.	Inhibición de la activación de la caspasa 3 mediante el bloqueo de la formación del apoptosoma mediado por la protimosina $\alpha$ .....	35
ii.	Regulación de la apoptosis mediante el complejo p8/protimosina $\alpha$ .....	38
iii.	Actividad antiapoptótica de la protimosina $\alpha$ regulada por la proteína HuR.....	39
iv.	La protimosina $\alpha$ y SET como reguladores de la apoptosis.....	40
v.	Fragmentación de la protimosina $\alpha$ en apoptosis.....	40
6.4.	PROTIMOSINA $\alpha$ Y ESTRÉS OXIDATIVO.....	43
6.5.	PROTEOLISIS DE LA PROTAMOSINA $\alpha$ .....	44
6.6.	LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTAMOSINA $\alpha$ .....	47
i.	Fosforilación de la protimosina $\alpha$ y proliferación celular.....	47
ii.	Caracterización de la enzima quinasa responsable de la fosforilación de la protimosina $\alpha$ en células en proliferación.....	49
	<i>a. Caracterización preliminar de la proteína quinasa de la protimosina <math>\alpha</math> (ProTaK).....</i>	49
	<i>b. Sustratos y especificidad de la ProTaK.....</i>	50
	<i>c. Actividad de la proteína quinasa de la protimosina <math>\alpha</math> en diferentes tipos celulares.....</i>	50
	<i>d. Fosforilación de la protimosina <math>\alpha</math> por la ProTaK en células activadas para proliferar.....</i>	51
	<i>e. Regulación de la ProTaK por procesos de fosforilación/desfosforilación.....</i>	51
iii.	Actividad ProTaK y significado biológico de la fosforilación de la protimosina $\alpha$ en la célula.....	52

# I. INTRODUCCIÓN

## 1. LAS TIMOSINAS

El papel esencial del timo en el desarrollo del sistema inmune se ha dirigido a la búsqueda intensiva, aislamiento e identificación de los factores tímicos biológicamente activos que pueden suplir muchas de las deficiencias ocasionadas por su extirpación, o potenciar la competencia inmunológica en individuos normales. A mediados de los sesenta, una fracción de timo de ternera denominada timosina [Goldstein *et al.*, 1966] mostró que potenciaba la inmunofunción en varios sistemas *in vitro* e *in vivo* [revisado en Low *et al.*, 1985]. La preparación de timosina mejor conocida es un extracto de timo de ternera denominado fracción de timosina 5 (TF5), la cual contiene unos 30 polipéptidos termoestables con un peso molecular comprendido entre los 1000 y 15000 daltons [Goldstein *et al.*, 1972; Hooper *et al.*, 1975; Low *et al.*, 1979a]. El sistema de nomenclatura para las timosinas está basado en su punto isoeléctrico (pI):  $\alpha$  para pI menores de 5,  $\beta$  para pI entre 5 y 7, y  $\gamma$  para pI mayores de 7 (indicado en la figura 1A).

El componente más característico de la TF5 es un polipéptido ácido (pI 4.2) denominado timosina  $\alpha_1$  ( $T\alpha_1$ ). Este polipéptido fue el primer componente de la TF5 en ser purificado y secuenciado [Goldstein *et al.*, 1977]: es un polipéptido de 28 aminoácidos, con una serina acetilada en el fragmento N-terminal y sin residuos aromáticos ni azufrados.

Otro componente  $\alpha$  de la TF5 fue purificado más tarde y establecida su secuencia: la timosina  $\alpha_{11}$  ( $T\alpha_{11}$ ) [Caldarella *et al.*, 1983]. La  $T\alpha_{11}$  es un polipéptido de 35 aminoácidos relacionado estructuralmente con la  $T\alpha_1$ , pero contiene 7 aminoácidos adicionales en su extremo C-terminal. Este polipéptido es aproximadamente 4 veces menos abundante que la  $T\alpha_1$  en la TF5, aunque muestra una actividad similar a la  $T\alpha_1$  en algunos ensayos *in vivo*.

Los componentes  $\beta$  de la TF5 también han sido aislados y secuenciados. La timosina  $\beta_1$  ha sido identificada como ubiquitina [Low *et al.*, 1979b]; la timosina  $\beta_4$  (el miembro más abundante de esta familia de péptidos) [Low *et al.*, 1981] y sus homólogos  $\beta_8$ ,  $\beta_9$  [Hannappel *et al.*, 1982b] y  $\beta_{10}$  [Hall *et al.*, 1990], así como sus derivados, han sido también aislados y sus estructuras establecidas.

Los efectos de las  $\beta$ -timosinas en la función inmunológica, de acuerdo con diversos ensayos biológicos [Low *et al.*, 1985], son menos relevantes que los de las  $\alpha$ -timosinas. La ubicua distribución de las  $\beta$ -timosinas en extractos de tejidos de mamíferos [Hannappel *et al.*, 1982a], aves y anfibios [Erickson-Vitanen *et al.*, 1982], así como su expresión génica en diversos tejidos animales [Gómez-Márquez *et al.*, 1989a, 1996; Gómez-Márquez & Anadón, 2002], sugieren fuertemente que las  $\beta$ -timosinas tienen una función biológica más generalizada (incluso funciones celulares no relacionadas específicamente con el sistema inmune han sido descritas [revisado en Huff *et al.*, 2001]). En este sentido, las  $\beta$ -timosinas han sido caracterizadas como proteínas de unión a actina, y la función bioquímica de la timosina  $\beta_4$  como péptido regulador de los mecanismos de polimeración de la actina es bien conocida [Safer *et al.*, 1990, 1991; Vancompernelle *et al.*, 1992; Huff *et al.*, 1995; Huff & Hannappel, 1997].

La timosina  $\beta_4$  está implicada en la reparación de tejidos lesionados [Goldstein *et al.*, 2005], en procesos de angiogénesis [Malinda *et al.*, 1997] y neovascularización [Smart *et al.*, 2007], en la movilidad celular, sinaptogénesis y otras fases relacionadas con la plasticidad sináptica [Bamburg & Bernstein, 1991], en la diferenciación neuronal [Carpintero *et al.*, 1995] y en el desarrollo cardiovascular [Gómez-Márquez *et al.*, 1996]. Así, en estas y otras actividades biológicas (en las que la actina tiene un papel crucial) la timosina  $\beta_4$  participa controlando el remodelado del citoesqueleto celular.

Las  $\gamma$ -timosinas no han sido caracterizadas.

## 2. LAS TIMOSINAS $\alpha$ Y SU PRECURSOR

La glándula tímica es un órgano linfoide en el que se produce la inmunocapacitación de los linfocitos T, responsables tanto de la inmunidad humoral como de la celular. A las timosinas  $\alpha$  se les atribuía un papel como señalizadores moleculares de los linfocitos T en el timo, influenciando su diferenciación e inmunocapacitación dentro de este órgano. La interacción de las timosinas, y otros componentes del medio intratímico, con los linfocitos inmunológicamente incompetentes recién llegados a este órgano, procedentes de la médula ósea, propiciaría la generación de las diferentes poblaciones de linfocitos T capaces de ejercer la actividad inmunológica después de su exportación del timo a los demás tejidos del sistema inmune. Estas poblaciones de linfocitos T diferenciados: células CD4+, CD8+, y linfocitos T de memoria, son las responsables de la inmunidad celular y también de la inmunidad humoral, puesto que cooperan con la actividad de los linfocitos B [Low & Goldstein, 1985].

La importancia aparente de las  $\alpha$ -timosinas como efectores del desarrollo y de la función de los linfocitos dependientes del timo animó, desde 1977, la investigación dirigida a caracterizar el origen celular de estos polipéptidos y su función biológica.

Entre estos péptidos tímicos, la timosina  $\alpha_1$  era el más característico, siendo éste el primero en ser purificado [Goldstein *et al.*, 1977]. El descubrimiento posterior de dos péptidos, la  $T\alpha_{11}$  y la des-timosina  $\alpha_1$ , que poseían la misma secuencia que la  $T\alpha_1$  en su extremo amino terminal [Caldarella *et al.*, 1983], apoyaba la idea de la existencia de un precursor común.

La estrategia seguida para investigar si estos péptidos podrían estar sintetizados a partir de un precursor común fue la caracterización de los productos de la traducción *in vitro* de los mRNAs aislados de timo de ternera, empleando anticuerpos contra la timosina  $\alpha_1$ . El análisis estructural de los productos inmunoprecipitados demostró la existencia de una proteína de 16 kDa (determinada mediante el protocolo de Weber & Osborn, 1969: en SDS-PAGE a pH 7) que incluye a la  $T\alpha_1$  en su secuencia [Freire *et al.*, 1978]. El aislamiento del mRNA que codifica para esta proteína [Freire *et al.*, 1981; Rey-Campos *et al.*, 1983] confirmó la existencia de un precursor de la  $T\alpha_1$  y apoyó la

hipótesis original: la  $T\alpha_1$  y quizás la  $T\alpha_{11}$  eran generadas por proteólisis de un péptido de mayor tamaño.

Posteriormente, este precursor fue aislado y secuenciado de extractos de timo de rata [Haritos *et al.*, 1984b; Haritos *et al.*, 1985a] usando procedimientos que minimizaban la actividad proteolítica: el análisis de los componentes de los extractos tímicos preparados en estas condiciones indicaron la ausencia de la  $T\alpha_1$  y la presencia de un polipéptido de mayor longitud con la secuencia de la  $T\alpha_1$  en su extremo N-terminal, y que mostraba las características del precursor descrito previamente [Haritos *et al.*, 1984a]. A esta proteína (figura 1B), de secuencia muy conservada y que contiene en su estructura (en su extremo N-terminal) la secuencia de las timosinas  $\alpha$  (figura 1C), se la denominó protimosina  $\alpha$  (ProT $\alpha$ ).

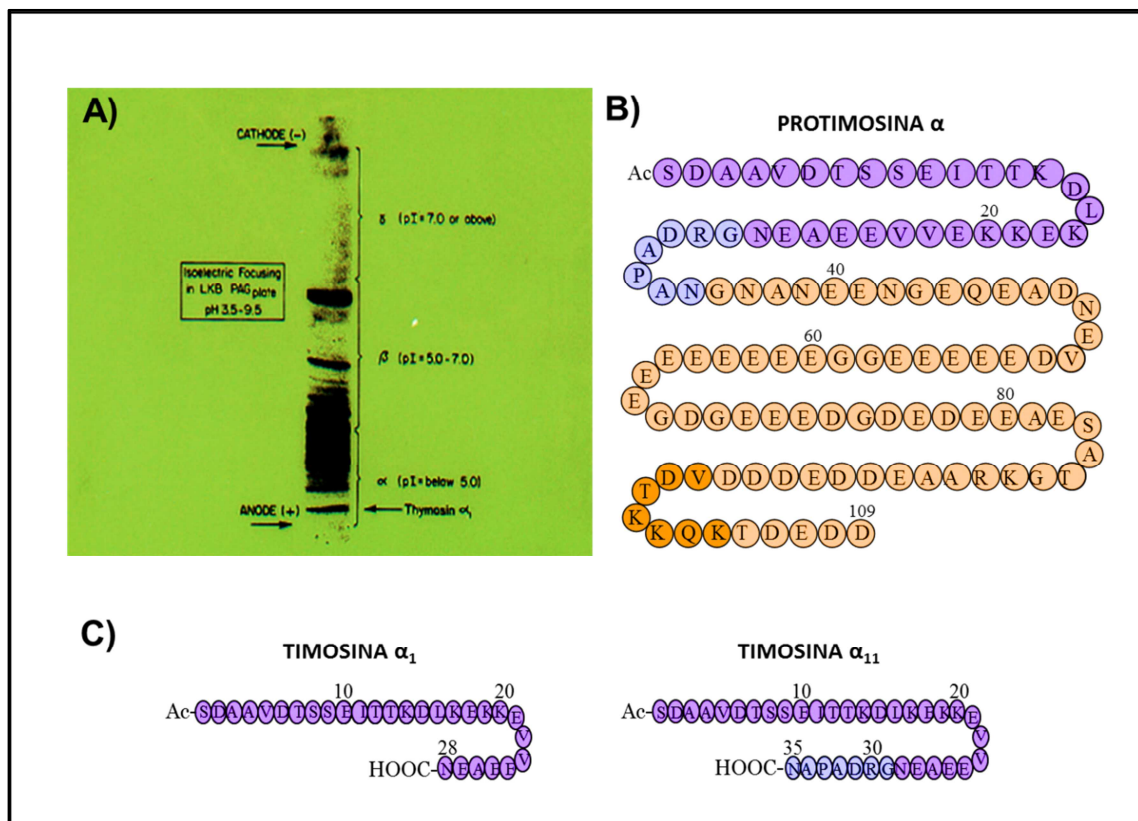


Figura 1. Composición de la TF5 de timo de ternera (A) y secuencia de la protimosina  $\alpha$  (B) y de las timosinas  $\alpha$  purificadas (C).

### 3. ESTRUCTURA DE LA PROTIMOSINA $\alpha$ Y SU EXPRESIÓN EN LOS DIFERENTES TEJIDOS

Posteriormente, la ProT $\alpha$  fue aislada en diferentes tejidos y secuenciada en humanos [Pan *et al.*, 1986], ternera [Panneerselvam *et al.*, 1988], cerdo [Economou *et al.*, 1988], ratón [Low *et al.*, 1990] y cabra [Frillingos *et al.*, 1991]. Su estructura primaria se confirmó por secuenciación de su cDNA procedente de células humanas [Eschenfeldt & Berger, 1986; Goodall *et al.*, 1986; Gómez-Márquez *et al.*, 1989b]. Polipéptidos similares a la ProT $\alpha$  han sido hallados en otros vertebrados, incluyendo pollo y trucha, a concentraciones 30 veces menores que las encontradas en timo de ternera [Yialouris *et al.*, 1988]; mientras que el mRNA de una proteína ácida que muestra una fuerte homología en su secuencia con la ProT $\alpha$  de mamíferos ha sido encontrado en rana, aunque los niveles celulares de esta proteína no han sido determinados [Aniello *et al.*, 2002]. Al mismo tiempo, la ProT $\alpha$  procedente de rata [Frangou-Lazaridis *et al.*, 1988], ratón [Schmidt *et al.*, 1991], y cerdo [Wintero *et al.*, 1996] fueron clonadas y sus cDNA secuenciados.

Los resultados de estos trabajos concluyeron las siguientes características de esta proteína:

- La amplia distribución tisular de la ProT $\alpha$ , así como la elevada concentración a la que esta proteína está presente en las células (del orden de 0.2 pg/célula) [Franco *et al.*, 1992], muy superior a la de una hormona. De esto se deducen dos importantes consideraciones: a) la presencia generalizada de la ProT $\alpha$  en los diferentes tejidos es indicativa de una función básica de esta proteína en la actividad de las células de mamífero no relacionada exclusivamente con la actividad del sistema inmunitario y la inmunocapacitación intratímica de los linfocitos T; y b) la concentración preponderante de la ProT $\alpha$  en los diferentes tejidos, respecto a los demás polipéptidos timosínicos, parece indicar que esta proteína es la principal responsable de la actividad biológica de las timosinas  $\alpha$ .

- La ProT $\alpha$  es un polipéptido altamente ácido (pI 3.55, puede considerarse la proteína más ácida conocida en animales) con un peso molecular de 12.5 kDa. Posee entre 109-111 residuos aminoácidos de los cuales los 28 primeros se corresponden con la secuencia de la timosina  $\alpha_1$ , mientras que la des-timosina  $\alpha_1$  y la timosina  $\alpha_{11}$ , otros dos péptidos tímicos aislados de timo de rata [Caldarella *et al.*, 1983], coinciden respectivamente con los primeros 24 y 35 aminoácidos. En su secuencia hay una gran proporción de residuos ácidos (Glu 37% y Asp 25%) que se localizan mayoritariamente en su región central, lo que le confiere un carácter ácido y altamente hidrofílico. No posee aminoácidos azufrados ni aromáticos (figuras 1B y 2).
- La ProT $\alpha$  humana se presenta en dos isoformas, que difieren en la existencia o no de un resto de ácido glutámico en la posición 39 de la molécula [Eschenfeldt & Berger, 1986], confirmando los datos obtenidos mediante la secuenciación de esta proteína [Pan *et al.*, 1986].
- La estructura primaria de la ProT $\alpha$  predice estructuras secundarias en hélice  $\alpha$  y lámina  $\beta$  [Haritos *et al.*, 1985a]; sin embargo, ningún tipo de estructura secundaria ha sido detectada en condiciones fisiológicas [Watts *et al.*, 1990; Gast *et al.*, 1995]. A pH neutro, la ProT $\alpha$  se mantiene como una cadena no plegada, debido probablemente a las repulsiones entre las cargas negativas [Watts *et al.*, 1990]. Este hecho podría explicar su comportamiento anómalo en cromatografía de filtración molecular, donde se deduce un peso molecular unas 5 veces superior al que realmente posee [Haritos *et al.*, 1989].
- En cuanto a su estructura cuaternaria, estudios de sedimentación en equilibrio en condiciones fisiológicas [Gast *et al.*, 1995; Haritos *et al.*, 1989] demostraron que la ProT $\alpha$  se encuentra en forma de monómero.



- Otras características estructurales destacables de la ProT $\alpha$  con importantes implicaciones funcionales son la acetilación de la Ser-N-terminal [Goldstein *et al.*, 1977; Michalewsky *et al.*, 1983; Sburlati *et al.*, 1993; Nogueira & Freire, 1985], la presencia de una señal de localización nuclear en su extremo C-terminal (TKKQKT) [Gómez-Márquez & Segade, 1988; Manrow *et al.*, 1991; Rubtsov *et al.*, 1997] y la existencia en su secuencia de lugares de fosforilación para la caseína quinasa 2 (CK-2) en sus extremos amino y carboxi-terminal [Barcia *et al.*, 1992] (figura 2B).

Entre las proteínas más reseñables que presentan homología con la ProT $\alpha$  se encuentra la paratimosina  $\alpha$ , un péptido inicialmente aislado a partir de extractos tímicos de rata [Haritos *et al.*, 1985b, c], que se halla distribuido en varios tejidos de mamíferos [Clinton *et al.*, 1989] y presenta una similitud del 43% con la ProT $\alpha$  [Komiyama *et al.*, 1986], y que se ha demostrado que interviene en el metabolismo de carbohidratos [Brand & Heinickel, 1991; Brand *et al.*, 1991].

Asimismo, la ProT $\alpha$  presenta un 47% de homología parcial con la proteína nuclear no histónica HMG1 [Otero., 1993]. Además, su dominio ácido central la asemeja a ciertos péptidos nucleares que interactúan con histonas, como la nucleoplasmina [Laskey *et al.*, 1978], N1/N2 [Kleinschmidt *et al.*, 1986], la nucleolina [Lapeyre *et al.*, 1987] o la nucleofosmina [Chang *et al.*, 1989].

La no detección por Haritos *et al.*, 1984a, de la T $\alpha_1$  en extractos de timo de rata en condiciones de inhibición de la proteólisis, llevó a la hipótesis de que la ProT $\alpha$  era el único péptido nativo presente en las células, y que la T $\alpha_1$  y otros péptidos relacionados serían artefactos producidos por la rotura incontrolada de la ProT $\alpha$  durante el proceso extractivo, y no el resultado de una proteólisis específica en la célula [revisado en Szabo & Weksler, 1992]. Sin embargo, investigaciones en nuestro laboratorio demostraron la presencia simultánea de la ProT $\alpha$  y la T $\alpha_1$  en extractos de timo de ternera obtenidos en condiciones de inhibición drástica de la proteólisis [Freire *et al.*, 1985; Franco *et al.*, 1992], lo que demostraba la producción natural de las timosinas  $\alpha$  a partir de la ProT $\alpha$ . La fuerte asociación de la T $\alpha_1$  con otros componentes de los



Los primeros estudios sobre la expresión de la ProT $\alpha$  en diferentes tejidos se llevaron a cabo mediante técnicas de inmunofluorescencia y de radioinmunoensayo. Utilizando la técnica de radioinmunoensayo, la ProT $\alpha$  se ha localizado fundamentalmente en timo, aunque también se ha encontrado en cerebro, hígado, riñón, pulmón y bazo de rata [Haritos *et al.*, 1984b]. En humanos se ha inmunodetectado en timo [Dalakas *et al.*, 1981], encontrándose altos niveles en leucocitos y, en muy pequeña cantidad, en plasma [Panneerselvam *et al.*, 1987], lo cual se atribuyó a contaminaciones a partir de la fracción leucocitaria.

El estudio de la distribución de la ProT $\alpha$  en los diferentes tejidos de ratón realizado en nuestro laboratorio [Franco *et al.*, 1992] es coincidente con los niveles de mRNA [Bustelo *et al.*, 1991]. Estos niveles fueron profundamente estudiados y mostraron que la ProT $\alpha$  se expresa principalmente en tejidos linfoides (figura 3). Además, el estudio de la expresión en otros tejidos y células demostró que la ProT $\alpha$  es expresada exclusivamente en tejidos de mamíferos.

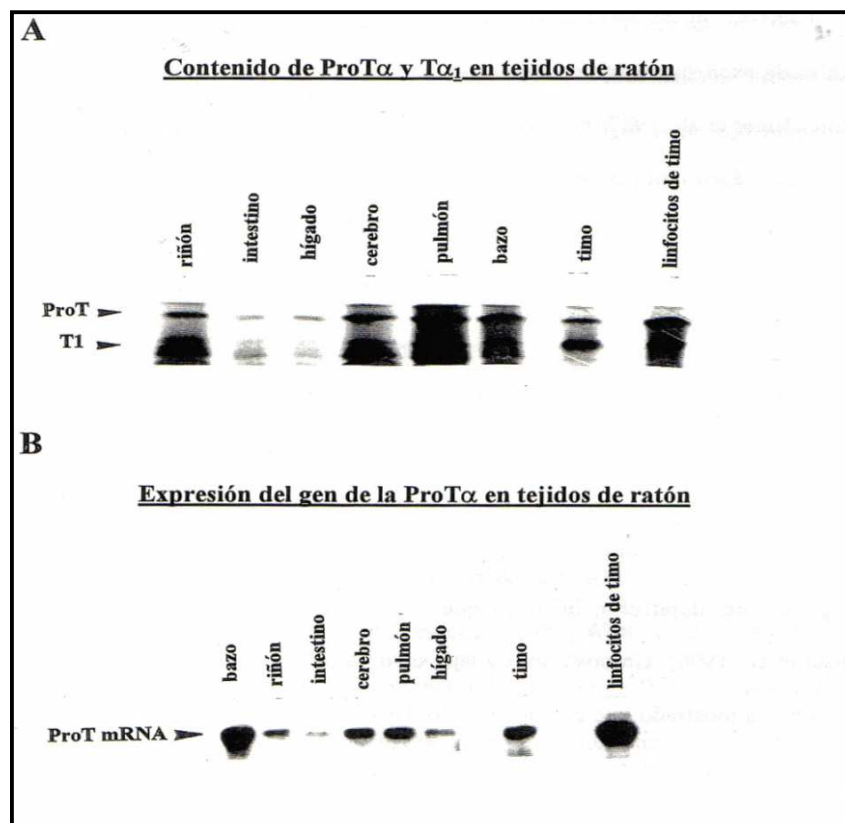


Figura 3. Distribución de la ProT $\alpha$  y expresión del gen de esta proteína en diversos tejidos de ratón. A) [Franco *et al.*, 1992]. B) [Bustelo *et al.*, 1991].

Cabe destacar que la ProT $\alpha$  es sintetizada en polisomas libres y carece de secuencia de señal secretora [Eschenfeldt *et al.*, 1989], lo que indica que posee un sitio intracelular de acción, o que su liberación al medio extracelular ocurre por un mecanismo no convencional de secreción.

Por otra parte, la presencia de la ProT $\alpha$  en el suero [Panneerselvam *et al.*, 1987] y en los sobrenadantes de cultivos de timocitos [Franco *et al.*, 1989] debería, quizás, ser atribuida a la liberación de las células tímicas y otros tipos celulares a causa de la apoptosis.

## 4. GENES DE LA PROT $\alpha$

Un completo estudio de la estructura del gen de la ProT $\alpha$  humana ha sido realizado [Eschenfeldt *et al.*, 1989] con el objetivo de identificar los miembros de la familia génica de esta proteína.

En humanos, el gen para la ProT $\alpha$  forma parte de una familia génica de 6 miembros en la que se incluyen 5 pseudogenes procesados, que carecen de intrones y no parece que produzcan transcritos *in vivo* [Manrow *et al.*, 1992; Rubtsov & Vartapetian, 1995], con los que posee una homología que varía entre el 30-90%. Ninguno de ellos contiene secuencia codificadora para un péptido señal amino-terminal.

El gen que contiene intrones (4), exones (5) y las señales regulatorias clásicas, parece ser la única fuente de mRNA de la ProT $\alpha$  [Eschenfeldt *et al.*, 1989]. Tiene un tamaño de 5 kilobases. Como regiones reguladoras de la transcripción presenta una caja TATA, una región rica en GC y dos cajas CCAAT [Eschenfeldt *et al.*, 1989]. El gen ha sido mapeado en el cromosoma 2 humano [Szabo *et al.*, 1993].

Asimismo, se comprobó la existencia de un lugar de *corte y empalme* alternativo entre el segundo intrón y el tercer exón, que es el proceso responsable de la generación de las dos isoformas descritas para la ProT $\alpha$  a partir del producto de transcripción de un único gen (el mRNA de la ProT $\alpha$  en fibroblastos humanos tiene un codón interno de glutamato extra (Glu<sup>39</sup>) con respecto al mRNA de bazo) [Manrow & Berger, 1993; Goodall *et al.*, 1986; Gómez-Márquez *et al.*, 1989b].

Las rutas de señalización intracelular que controlan la expresión del gen de la ProT $\alpha$  no han sido bien caracterizadas. Sin embargo, se han propuesto varios factores de transcripción que regularían su expresión, incluyendo E2F [Szabo *et al.*, 1993] y c-myc [Eilers *et al.*, 1991; Desbarats *et al.*, 1996; Gaubatz *et al.*, 1994] como reguladores positivos, y el factor inhibidor de tumores p53 como un regulador negativo [Zhao *et al.*, 2000].

Así, E2F puede controlar directamente la expresión de la ProT $\alpha$  en el ciclo celular mediante la activación del promotor del gen de esta proteína.

Por otra parte, regiones reguladoras localizadas en el primer intrón del gen de la ProTα (elementos E-box) han sido propuestas como sitios de unión del heterodímero de factores Myc-Max para la estimulación de la transcripción de la ProTα [Gaubatz *et al.*, 1994]. No obstante, otros autores han puesto en duda la activación de la expresión del gen de la ProTα por parte de la proteína c-myc [Mol *et al.*, 1995].

Además, se ha encontrado que la regulación negativa de p53 sobre el gen de la ProTα implica un incremento de la actividad transcripcional de p53 y la acetilación de este factor como respuesta a la ProTα endógena [Kobayashi *et al.*, 2006].

Además del cDNA de la ProTα humana [Goodall *et al.*, 1986], se han clonado los correspondientes de rata [Frangou-Lazaridis *et al.*, 1988] y ratón [Schmidt & Werner, 1991]. En rata no se ha llegado a identificar el gen de la ProTα, aunque se han aislado varios pseudogenes procesados [Dosil *et al.*, 1990].

La expresión del gen de la ProTα se ha evaluado también durante el desarrollo embrionario de ratón, donde se encontró restringida a las estructuras derivadas del ectodermo y mesodermo [Franco del Amo & Freire, 1995]. Un trabajo posterior (centrado en la preimplantación del embrión de ratón) ha mostrado que el gen de la ProTα es transcripcionalmente inducido durante el estadio de dos células y el mRNA aumenta gradualmente durante los estadios de mórula y blastocisto, inicialmente en clara dependencia de los niveles de proteína/mRNA myc maternos y después de los niveles de expresión de los diferentes genes de la familia myc específicos de cada estadio [Domashenko *et al.*, 1997].

Un estudio durante el desarrollo embrionario de rata demostró que el gen se encuentra regulado de forma específica según los tejidos, ya que en hígado, cerebro, riñón y testículos su expresión es mayor en periodos tempranos del desarrollo, mientras que en timo sus niveles prácticamente no varían [Dosil *et al.*, 1990].

No está claro todavía si en estos y otros animales existe solamente un único gen funcional de la ProTα.

## 5. CONCENTRACIÓN Y DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE LA PROTIMOSINA $\alpha$

La concentración de la ProT $\alpha$  ha sido determinada en varios tejidos de mamíferos mediante inmunoensayo y mediante determinación directa de la proteína separada por técnicas cromatográficas (tabla 1), aunque se observan importantes variaciones incluso en estudios que utilizan el mismo procedimiento.

En la cuantificación por determinación directa, las variaciones observadas son probablemente atribuibles a diferencias en el procedimiento de separación cromatográfica. Procedimientos en los que se combinan técnicas de intercambio iónico y HPLC para aislar productos ácidos termoestables [Hannappel *et al.*, 1982c; Haritos *et al.*, 1984a] parecen ser más eficientes para separar a la ProT $\alpha$  y las timosinas  $\alpha$  [Franco *et al.*, 1992].

TEJIDO	RATA			TERNERA			CERDO
Timo	116.3 $\pm$ 12.4 <sup>a</sup>	82 <sup>b</sup>	50 <sup>c</sup>	5 <sup>d</sup>	50 <sup>e</sup>	14.6 <sup>f</sup>	16 <sup>g</sup>
Bazo	89.4 $\pm$ 10.3 <sup>a</sup>						
Pulmón	76.6 $\pm$ 9.5 <sup>a</sup>						
Riñón	56.9 $\pm$ 6.2 <sup>a</sup>						
Hígado	42.6 $\pm$ 5.5 <sup>a</sup>						
Corazón	44.0 $\pm$ 5.0 <sup>a</sup>						
Linfocitos-T	92.5 $\pm$ 9.2 <sup>a</sup>						
Timocitos	123.4 $\pm$ 14.9 <sup>a</sup>			145.8 $\pm$ 13.8 <sup>a</sup>			

**TABLA 1.** Protimosina  $\alpha$  recuperada ( $\mu$ g/g de tejido) de tejidos animales, determinada mediante varios métodos de purificación.

Los datos compilados en la tabla 1 proceden de: a, [Franco *et al.*, 1992]; b, [Haritos *et al.*, 1985b]; c, [Palvimo & Linnala-Kankkunen, 1990]; d, [Sburlati *et al.*, 1993]; e, [Karetsou *et al.*, 1998]; f, [Watts *et al.*, 1990]; g, [Economou *et al.*, 1988].

Estudios de inmunolocalización han demostrado la presencia de la ProTα en el citoplasma y en el núcleo celular [Conteas *et al.*, 1990; Enkemann *et al.*, 2000a; Vareli *et al.*, 2000], con una mayor presencia en el núcleo de células en proliferación [Conteas *et al.*, 1990].

Sin embargo, el análisis de la presencia de la ProTα en fracciones subcelulares obtenidas de diferentes tejidos mediante métodos convencionales de fraccionamiento subcelular muestran que está indefectiblemente ubicada en la fracción citosólica. En nuestro laboratorio [Franco *et al.*, 1992] y en el de otros grupos [Tsitsiloni *et al.*, 1989; Watts *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1995] han encontrado también que en extractos subcelulares la ProTα aparece en las fracciones citosólicas; de manera que sólo utilizando métodos extractivos en los que se utilizan condiciones especiales de bloqueo de los poros nucleares con citocalasina B se permite aislar la ProTα en las fracciones nucleoplasmáticas [Manrow *et al.*, 1991]. Esta localización de la ProTα en las fracciones citosólicas reproduce el comportamiento de muchas proteínas nucleares ácidas de estructura similar a la ProTα, como la nucleoplasmina [Laskey & Earnshaw, 1980], y la proteína HMG1 [Gordon *et al.*, 1981], entre otras que, a pesar de su función nuclear, aparecen en las fracciones citosólicas de los fraccionados subcelulares.

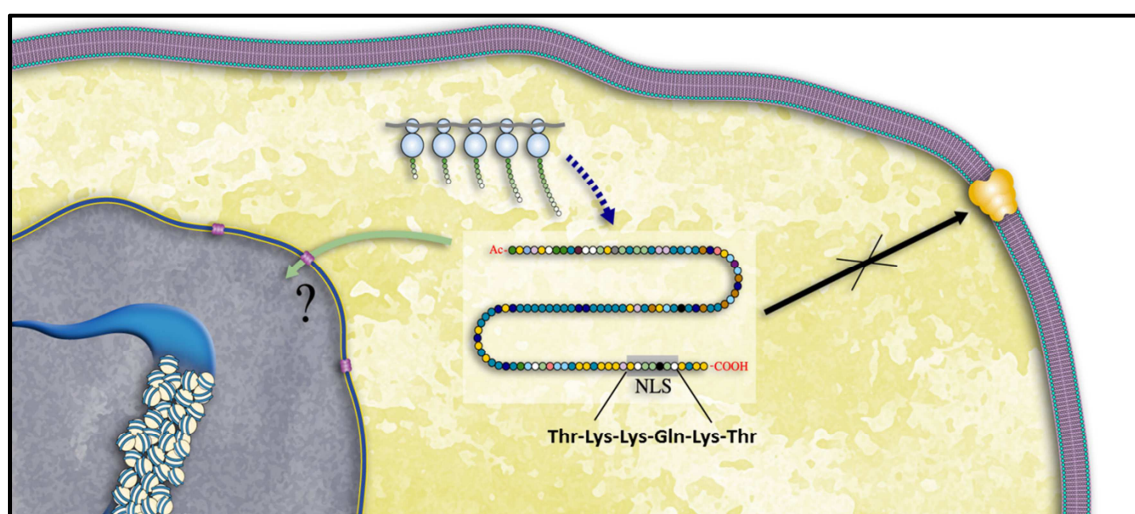
La presencia de una señal cariofílica en la región C-terminal de la ProTα involucrada en su localización nuclear, y su expresión sin un péptido señal de secreción [Manrow *et al.*, 1991; Watts *et al.*, 1990; Clinton *et al.*, 1991; Eschenfeldt & Berger, 1986; Goodall *et al.*, 1986; Eschenfeldt *et al.*, 1989], así como la interacción de la ProTα con proteínas implicadas en el transporte nuclear, incluyendo la Karioferina β, Rch-1, Ran y RCC-1 [Freire *et al.*, 2001] y con otras proteínas relacionadas con el transporte de RNA fuera del núcleo como Rev/Rex [Kubota *et al.*, 1995], apoyan la propiedad de la movilidad nuclear-citoplasmática de la ProTα. Estos resultados sugieren que la ProTα es una proteína difusible nuclear-citoplasmática (y tiene una fuerte tendencia a liberarse del núcleo cuando las células son lisadas en tampones isotónicos o suplementados con



detergentes), aunque reside predominantemente en el núcleo celular, y mantiene esta distribución mediante un transporte continuo (salida y reentrada) a través del poro nuclear [Enkemann *et al.*, 2000a].

Además, la separación de complejos multiproteicos citoplasmáticos y nucleoplasmáticos con afinidad por la ProT $\alpha$  mediante cromatografía sobre ProT $\alpha$ -Sepharosa constituye una evidencia de este tipo de funcionalidad [Pérez-Estévez *et al.*, 1997; Freire *et al.*, 2001].

En este sentido, otros estudios de localización subcelular han indicado la posible asociación de la ProT $\alpha$  nuclear con la cromatina [Conteas *et al.*, 1990; Vareli *et al.*, 2000; Vareli & Frangou-Lazaridis, 2004]. Así, en las células en interfase esta proteína presenta una distribución nuclear asociada con sitios activos de transcripción, mientras que durante la mitosis la ProT $\alpha$  colocaliza con la  $\alpha$ -tubulina en el huso mitótico [Vareli *et al.*, 1996; Vareli & Frangou-Lazaridis, 2004].



**Figura 4.** Transporte de la protimosina  $\alpha$  al núcleo de la célula mediante un proceso dependiente de la señal de localización nuclear situada en el extremo C-terminal de su secuencia.

## 6. EVOLUCIÓN POST-BIOSÍNTESIS Y FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LA PROTIMOSINA $\alpha$ .

El estudio de la función biológica de la ProT $\alpha$  presenta numerosas dificultades: su baja inmunogenicidad ocasiona que la mayoría de los inmunoensayos (tanto en extractos celulares como en células intactas) muestren una baja eficiencia y sensibilidad, su débil interacción con las membranas utilizadas normalmente en experimentos de *Immunoblotting* resulta en una menor eficacia, y la inhibición del crecimiento que provoca en células de levaduras [Pavlov *et al.*, 1995] no hace viable el uso del sistema de doble-híbrido para la caracterización de interacciones proteína-proteína *in vivo*. Sin embargo, se han realizado progresos en la elucidación de la función biológica de esta proteína deducidos de sus propiedades estructurales, del estudio de su expresión génica y de su evolución post-biosíntesis, y del análisis de la interacción con otras proteínas en diferentes facetas de la actividad celular. Así, su presencia ubicua en diferentes tejidos de mamíferos implica una función más generalizada que la propuesta implicación exclusiva en el sistema inmunitario. Por otra parte, las características de su secuencia, con la ausencia de una señal secretora y la presencia de una señal cariofílica, además de su distribución en el citoplasma y núcleo celular, parecen indicar una función intracelular con localización citoplasmática/nuclear.

Su carácter de precursor de las timosinas  $\alpha$  hizo que, en principio, se le asignara una función relacionada con la actividad inmunorreguladora de estas proteínas [Low & Goldstein, 1984]. En este sentido se realizaron ensayos que encontraron que poseía efectos protectores frente a infecciones de microorganismos oportunistas con más potencia que la T $\alpha_1$  [Pan *et al.*, 1986; Salvin *et al.*, 1987], que sus niveles estaban disminuidos en ratones inmunodeprimidos [Low *et al.*, 1990] y que mostraba características inmunopotenciadoras [revisado en Piñeiro *et al.*, 2000]. Sin embargo, estos efectos han sido atribuidos a mecanismos xenobióticos [Eschenfeldt *et al.*, 1989], ya que las mencionadas características estructurales, distribución generalizada y la propia concentración intracelular descartan la supuesta función hormonal de la ProT $\alpha$ . Estos mecanismos xenobióticos pueden ser debidos a que la ProT $\alpha$  presenta

homologías con el interferón  $\alpha_2$  en la secuencia Leu-Lys-Glu-Lys-Lys (residuos 16-20 de la ProT $\alpha$  humana); de hecho, el péptido sintético Leu-Lys-Glu-Lys-Lys-Tyr-Ser-Pro tiene efectos regulatorios de la respuesta inmune celular y humoral [Zav'yalov *et al.*, 1991].

En conclusión, las características de la síntesis de la ProT $\alpha$ , su amplia distribución y elevada concentración en diversos tipos celulares, su regulación estructural con proteínas nucleares acídicas, y los experimentos de migración al núcleo [Watts *et al.*, 1989; Clinton *et al.*, 1991; Manrow *et al.*, 1991] apuntan hacia una función bioquímica intracelular de la ProT $\alpha$  en las células de mamíferos. Estas evidencias de una actividad intracelular de la ProT $\alpha$  se han fortalecido con la caracterización de una señal de localización nuclear en su extremo C-terminal [Rubsov *et al.*, 1997], que demuestra necesariamente un cometido nuclear de esta proteína en células HeLa [Clinton *et al.*, 1991], COS [Manrow *et al.*, 1991], y 293 [Rubtsov *et al.*, 1997].

En este contexto, el receptor de la ProT $\alpha$  encontrado en linfocitos [Piñeiro *et al.*, 2001] se ha propuesto, en opinión de los investigadores de nuestro laboratorio, como un muy improbable constituyente de un sistema de señalización celular mediado por la ProT $\alpha$ . Quizás estos receptores en la superficie celular puedan estar involucrados en la eliminación endocítica de la ProT $\alpha$  del suero procedente de células apoptóticas, siguiendo un proceso similar al descrito para la eliminación de mononucleosomas circulantes a través de la interacción con receptores específicos [Koutouzov *et al.*, 1996].

### 6.1. PROTIMOSINA $\alpha$ Y PROLIFERACIÓN CELULAR

El estudio de la expresión del gen de la ProT $\alpha$  fue importante para avanzar en el esclarecimiento de la función que esta proteína pudiera desempeñar en la actividad de las células. Las investigaciones de los niveles de expresión de la ProT $\alpha$  y de su mRNA en linfocitos mitóticamente activados [Gómez-Márquez *et al.*, 1989; Franco *et al.*, 1992; Eschenfeldt *et al.*, 1989; Bustelo *et al.*, 1991] y en diferentes poblaciones celulares [Eschenfeldt *et al.*, 1989; Gómez-Márquez *et al.*, 1989; Zalvide *et al.*, 1992] demostraron una clara relación entre los niveles de expresión de la ProT $\alpha$  con la

actividad proliferativa de estas células, con un incremento de la concentración del mRNA de esta proteína en células en división; sin embargo, este incremento era moderado en la mayoría de los tipos celulares estudiados [Bustelo *et al.*, 1991]. La correspondencia observada entre los niveles del mRNA de la ProTα y los niveles de la propia ProTα confirmaron la traducción activa del mensajero de la ProTα en los diferentes tejidos.

De esta manera, la expresión del gen de la ProTα en linfocitos con mayor capacidad proliferativa era superior a la que presentaban los linfocitos con menor capacidad para proliferar. Este resultado parecía establecer una dependencia entre los niveles de la concentración celular de la ProTα y la actividad proliferativa de las células. Esta consideración se vio confirmada por los experimentos en los que se analizó la variación de la expresión del gen de la ProTα en células en las que se indujo la actividad proliferativa *in vitro* e *in vivo* [Bustelo *et al.*, 1991].

Los elevados niveles de mRNA de la ProTα permanecen casi invariables a lo largo del ciclo celular, aunque se aprecia un incremento en el tránsito de G1-S; sin embargo, la expresión del gen no parece estar ligada a la síntesis de DNA [Bustelo *et al.*, 1991]. Este patrón ha sido corroborado por otros estudios en los cuales los niveles del mRNA o de la ProTα fueron determinados [Zalvide *et al.*, 1992; Vareli *et al.*, 1996; Contreas *et al.*, 1990; Rosón *et al.*, 1990]. No obstante, no hay evidencias de que la expresión de la ProTα regule directamente la mitosis, ya que la presencia de su mRNA no es suficiente para promover la progresión a lo largo del ciclo celular [Álvarez *et al.*, 1993].

En este sentido, la transfección de poblaciones celulares con un oligonucleótido antisentido complementario al mRNA de la ProTα provoca la paralización de la proliferación celular, con un efecto reversible [Sburlati *et al.*, 1991]. Trabajos posteriores mostraron que la transfección de poblaciones de células HL-60 con oligonucleótidos antisentido de la ProTα produce una inhibición de la proliferación celular a bajas concentraciones y una inducción de la apoptosis a altas concentraciones [Rodríguez *et al.*, 1999]. También en células HL-60 y NIH3T3 se observó que la sobreexpresión de la ProTα acelera la proliferación y retarda la diferenciación celular [Rodríguez *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1997]; complementando los datos que demuestran que los niveles del mRNA de la ProTα, elevados en las células en crecimiento

logarítmico, descienden cuando las células son inducidas a su diferenciación terminal [Smith *et al.*, 1993; Dosil *et al.*, 1993].

Los detalles moleculares de la relación existente entre la expresión del gen de la ProTα y la proliferación celular comenzaron con el descubrimiento de la capacidad de c-myc, una proteína involucrada en división la celular, para promover la transcripción del gen de la ProTα [Eilers *et al.*, 1991; Gaubatz *et al.*, 1994]. Aunque este hallazgo fue cuestionado [Mol *et al.*, 1995], posteriores resultados han confirmado el efecto de la proteína c-myc en la regulación de la expresión del gen de la ProTα [Wu *et al.*, 1997; Mori *et al.*, 1993; Vareli *et al.*, 1995; Lutz *et al.*, 1996; Kinoshita *et al.*, 1997; Ben-Yosef *et al.*, 1998].

El hallazgo de un incremento de la expresión del gen de la ProTα en células tumorales refuerza la relación de esta proteína con la proliferación celular [Eschenfeldt *et al.*, 1986; Tsitsiloni *et al.*, 1993; Gómez-Márquez *et al.*, 1989b; Wu *et al.*, 1997; Álvarez *et al.*, 1993; Mori *et al.*, 1993]. Los linfocitos de pacientes con linfomas, células con una alta actividad mitótica, poseen unos niveles de mRNA de la ProTα 4-6 veces superiores a los de las células normales [Gómez-Márquez *et al.*, 1989b; Contreas *et al.*, 1990; Álvarez *et al.*, 1993].

Paralelamente, la forma en la que la ProTα podría relacionarse con los mecanismos bioquímicos de la división de las células fue investigada analizando el comportamiento de esta proteína en las diferentes fases del ciclo celular, utilizando para ello linfocitos de bazo de ratón. El estudio del comportamiento de la ProTα en la transición de las fases G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> de los linfocitos de bazo, correspondientes con las etapas iniciales de la señalización de la célula por factores de crecimiento, propició un importante descubrimiento en nuestro laboratorio referido a la evolución molecular de la ProTα en este período: como consecuencia de la activación proliferativa de los linfocitos, la ProTα resultaba fosforilada [Barcia *et al.*, 1992; Barcia *et al.*, 1993].

Por otra parte, se ha descrito que la ProT $\alpha$  estimula la fosforilación dependiente de Ca<sup>+2</sup> del factor de elongación EF-2 durante la mitosis [Vega *et al.*, 1998]; sin embargo, dicho efecto ha sido cuestionado [Enkemann *et al.*, 1999], por lo que parece improbable que la ProT $\alpha$  actúe como un efector metabólico que modula la actividad de enzimas dependientes de Ca<sup>+2</sup> a lo largo del ciclo celular.

De todas estas aportaciones, puede deducirse que la función de la ProT $\alpha$  está relacionada con la actividad proliferativa de las células, y los resultados derivados son consistentes con la teoría de que la ProT $\alpha$  es necesaria para la división celular. Asimismo, la demostrada capacidad de la ProT $\alpha$  para migrar al núcleo y los datos que muestran que la actividad proliferativa celular es concomitante con un incremento de la concentración nuclear de la ProT $\alpha$  [Conteas *et al.*, 1990] parecen indicar que la función de esta proteína en la división celular es realizada en el núcleo.

## **6.2. PROTIMOSINA $\alpha$ Y ACTIVIDAD REMODELADORA DE LA CROMATINA**

### ***i. Interacción de la protimosina $\alpha$ con las histonas***

La caracterización de proteínas que interaccionan con la ProT $\alpha$  en el núcleo de la célula ha propiciado progresos en la elucidación del mecanismo por el cual la ProT $\alpha$  está involucrada en el metabolismo nuclear.

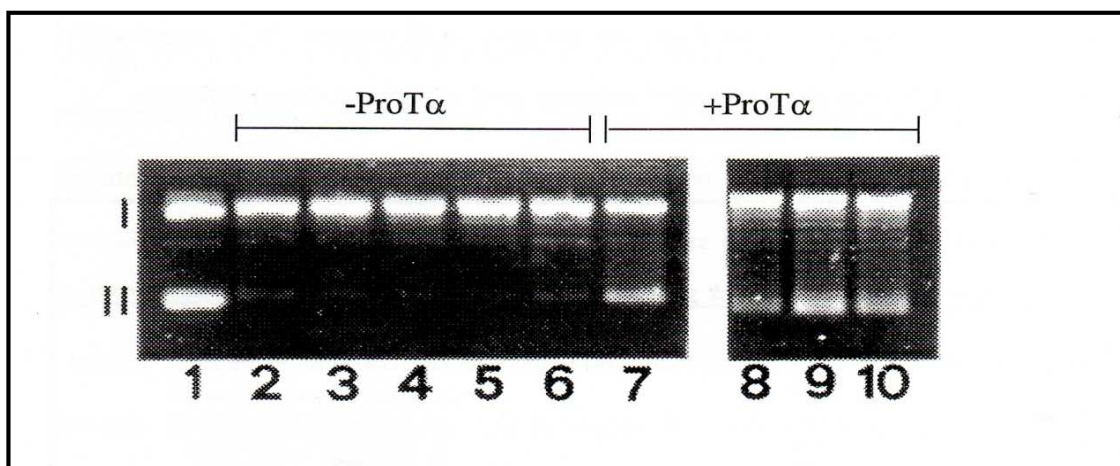
Así, las histonas son las proteínas nucleares cuya capacidad para interaccionar *in vitro* con la ProT $\alpha$  fue demostrada en primer lugar. Algunos ensayos han indicado que la ProT $\alpha$  interacciona solo con la histona H1 [Papamarcaki & Tsolas, 1994], mientras que otros experimentos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que puede interactuar con H1 y las histonas del octámero [Díaz-Jullien *et al.*, 1996; Covelo *et al.*, 2006]; sin embargo, la ProT $\alpha$  interactúa fuertemente con éstas últimas y débilmente con H1 [Freire *et al.*, 2001; Díaz-Jullien *et al.*, 1996]. Estas discrepancias se acentuaron con los resultados de experimentos dirigidos a la identificación de proteínas de unión a la ProT $\alpha$  en extractos de células NIH3T3 usando técnicas de inmunoafinidad (columnas de afinidad con anticuerpos anti-ProT $\alpha$  inmovilizados): las columnas retenían a la

ProT $\alpha$  y H1, pero la identidad de otras proteínas retenidas no fue investigada [Karetsou *et al.*, 1998]. De este modo, los experimentos que indican la interacción de la ProT $\alpha$  con H1 no constituyen evidencias en contra de la interacción de esta proteína con otras histonas, ya que en estos casos no se habían realizado ensayos de inmunoprecipitación cruzada ni tampoco analizado la presencia de otras histonas en los componentes con afinidad por la ProT $\alpha$ .

Así, la demostración de la capacidad de la ProT $\alpha$  para interactuar *in vitro* con las histonas [Díaz-Jullien *et al.*, 1996] constituyó un paso importante en la caracterización funcional de esta proteína. En la interacción con estas proteínas, más fuerte con las histonas H3 y H4, se ve implicada tanto la región menos acídica de la ProT $\alpha$ , localizada en su extremo N-terminal, como la secuencia poliacídica (con glutámico y aspártico entre los residuos 41 y 85) situada en la parte central de su estructura (figura 2B). En este sentido, en nuestro laboratorio hemos encontrado que la T $\alpha_1$ , el péptido correspondiente a los 28 primeros aminoácidos de la secuencia de la ProT $\alpha$ , también se une *in vitro* a las histonas del octámero con gran afinidad [Díaz-Jullien *et al.*, 1996], sugiriendo que esta región puede estar involucrada en la interacción *in vivo* de la ProT $\alpha$  con las histonas.

Esta capacidad de interacción de la ProT $\alpha$  con las histonas, similar a la que presentan otras proteínas acídicas de función nuclear como N1 y N2 de *Xenopus* [Kleinschmidt & Franke, 1982], que también muestran una afinidad preferente por las histonas H3 y H4, y otras proteínas de estructuras similares a la ProT $\alpha$  que han sido descritas en anfibios [Dingwall *et al.*, 1987] y levaduras [Ishimi & Kikuchi, 1991], es muy significativa a la hora de establecer una relación funcional de esta proteína en el proceso de la organización estructural del cromosoma y, más concretamente, del ensamblaje del nucleosoma.

Diversos experimentos han señalado que la ProT $\alpha$  es capaz de inducir el ensamblaje de los nucleosomas *in vitro* [Díaz-Jullien *et al.*, 1996] (figura 5). Esta capacidad es independiente de H1 y dependiente de otras proteínas separadas en extractos de linfocitos mediante cromatografía de afinidad sobre ProT $\alpha$  (afines también a ATP).



**Figura 5. Emsamblado de nucleosomas “*in vitro*” regulado por la ProTα.** La posición I indica una estructura del DNA en forma lineal y la posición II indica una organización nucleosómica del DNA.

En células HL-60 en las que se ha inducido la sobreexpresión de la ProTα se ha demostrado un incremento en la accesibilidad de la nucleasa micrococcal a la cromatina [Gómez-Márquez & Rodríguez, 1998]; sugiriendo que el patrón observado de mononucleosomas y multímeros de mononucleosomas es atribuible a la eliminación de la histona H1 de la cromatina mediada por la ProTα, originando el desensamblaje de la cromatina detectado microscópicamente en estas células [Boán *et al.*, 2001]. Sin embargo, otros grupos fallaron a la hora de demostrar la interacción de la ProTα con H1 en cromatina reconstituida *in vitro* [Karetsou *et al.*, 1998]; en su lugar estos autores encontraron que la ProTα no era efectiva para prevenir la interacción de H1 con la cromatina.

Estos estudios apoyan la implicación de la ProTα en la organización de la cromatina a través de su interacción con las histonas y de su capacidad para cooperar en el ensamblaje de los nucleosomas *in vitro* y en la alteración de la estructura cromosómica.

Además, mediante experimentos de coimmunoprecipitación, en nuestro laboratorio se ha demostrado la interacción *in vivo* de la ProTα con las histonas del octámero en el nucleoplasma de linfocitos en proliferación (células NC37) [Covelo *et al.*, 2006]. Estos resultados indican que dicha interacción ocurre con las histonas H3, H2A, H2B y H4; mientras que la histona H1 no fue detectada en los componentes separados por



afinidad a ProT $\alpha$ -Sepharosa. Las histonas del octámero forman parte de un complejo nuclear multiproteico, separado por cromatografía de afinidad, cuyos componentes incluyen enzimas modificadoras de histonas como las acetiltransferasas de H3 y H4 y la metiltransferasa de H3, proteínas de unión a RNA/DNA como las ribonucleoproteínas (hnRNPs) A3, A2/B1 y R y las DNA helicasas de tipo II (dependientes e independientes de ATP), y proteínas del citoesqueleto como la  $\beta$ -actina y la vimentina. La presencia de acetiltransferasas (HAT) y metiltransferasas (HMT) de histonas en este complejo sugiere una posible función de la ProT $\alpha$  en la modificación estructural de H3 y H4, las histonas más significativas en el control de la actividad de la cromatina. Los estudios que demuestran la habilidad de la ProT $\alpha$  para interaccionar con proteínas que se unen a HATs, como el antígeno nuclear del virus Epstein-Barr [Cotter & Robertson, 2000; Subramanian *et al.*, 2002] y la proteína de unión a CREB [Karetsou *et al.*, 2002] (ambas con afinidad por la acetiltransferasa p300), refuerzan esta teoría.

Debido a las propiedades de las hnRNPs, especialmente aquellas derivadas de su habilidad para inducir agregaciones de proteínas y reconocer secuencias discretas del DNA y RNA [Krecic & Swanson, 1999], su presencia en el complejo nuclear puede indicar la implicación de estas proteínas en la actividad de las HATs y HMTs y/o en otros aspectos de la actividad de la ProT $\alpha$  en la cromatina. De hecho, experimentos en nuestro laboratorio han demostrado la interacción directa de la ProT $\alpha$  con las hnRNP A2/B1 y A3 (resultados no publicados).

Las características estructurales y funcionales de la ProT $\alpha$  sugieren que esta proteína forma parte del grupo de proteínas de unión a histonas, proteínas ácidas que participan en mecanismos nucleares y citoplasmáticos, relacionados con la regulación de la cromatina y en algunos casos con la apoptosis. Otros miembros de este grupo son NAP1/NAP2 [Ishimi *et al.*, 1987; Rodríguez *et al.*, 2004], CAF-1 [Kaufman *et al.*, 1995], SET [Seo *et al.*, 2001] y pp32 [Seo *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 1996]: estas proteínas han sido implicadas en la regulación de la transcripción, en la replicación del DNA y en el ensamblaje de los nucleosomas en las células de mamíferos. Además, la ProT $\alpha$  muestra una marcada homología estructural con proteínas de unión a histonas descritas en otros organismos [Gómez-Márquez *et al.*, 1988], especialmente la nucleoplasmina de anfibios [Dingwall *et al.*, 1987]. La señal cariofílica en su extremo C-

terminal, su larga región ácida central e incluso la propiedad de ser fosforilada son semejanzas que comparten la ProTα y estas proteínas de unión a histonas [Earnshaw, 1987]. Ya que se ha demostrado que la nucleoplasmina y otras proteínas ácidas similares están involucradas en la movilidad del octámero de histonas dentro de la célula y en el remodelado de la cromatina [Philpott *et al.*, 2000], es plausible que la ProTα tenga una función similar en las células de mamíferos.

En este sentido, la descondensación de la cromatina producida por la ProTα facilitaría la unión de la RNA polimerasa II al DNA y activaría la transcripción; de hecho, la ProTα colocaliza en el núcleo con esta enzima activa [Enkemann *et al.*, 2000a; Vareli *et al.*, 2000]. Sin embargo, durante la mitosis, la ProTα permanece excluida del volumen ocupado por el DNA, probablemente para favorecer la condensación de éste [Enkemann *et al.*, 2000a].

No obstante, la función de la ProTα en el remodelado de la cromatina en las células de mamíferos no está completamente clara. Así, otros autores han investigado la posibilidad de que la ProTα funcione como una proteína chaperona de la histona H1 [George & Brown, 2010] definiéndola como un factor que se asocia directamente con esta histona y facilita su transferencia sin permanecer en el complejo final. Estos autores sugieren que la ProTα, componente de un complejo mayor, actuaría como una chaperona de H1 para promover su intercambio entre sitios de unión a la cromatina y facilitar su desplazamiento e incorporación *in vivo* durante la replicación del DNA. De este modo, la ProTα modularía la interacción de H1 con la cromatina provocando su remodelado o descondensación y potenciaría los procesos asociados de transcripción y replicación [Gómez-Márquez, 2007; Trumbore & Berger, 2000], en relación con su función en la proliferación celular.

Por otro lado, la habilidad de la ProTα para interactuar con las histonas está probablemente facilitada por su alta concentración intracelular, similar a la de las proteínas del octámero (aprox. una molécula de ProTα por nucleosoma) [Palvimo & Linnala-Kankkunen, 1990; Sburlati *et al.*, 1990, 1993]. Más argumentos a favor de la relación de la ProTα con la actividad de la cromatina vienen determinados por la caracterización de otras proteínas que interactúan con ella: el antígeno nuclear del

Epstein-Barr virus (EBNA3C), el coactivador de la transcripción CBP (proteína de unión a CREB), la acetiltransferasa de histonas p300, la oncoproteína SET, el factor de transcripción STAT3 y el represor del receptor de estrógeno (REA).

**ii. Interacción de la protimosina  $\alpha$  con la proteína de unión a CREB (CBP) y potenciación de la transcripción**

La ProT $\alpha$  interacciona con el coactivador de la transcripción CBP *in vivo* e *in vitro* y estimula la transcripción génica a través de la reorganización de la estructura de la cromatina [Karetsou *et al.*, 2002]. El sitio de interacción ha sido mapeado en el extremo N-terminal de CBP (residuos 1-771) y en una región rica en glutámico de la ProT $\alpha$ . Esta unión podría ser debida a las características específicas de la secuencia acídica y/o a su conformación local; sin embargo, en las condiciones experimentales empleadas en los estudios de interacción este motivo no adopta ninguna estructura secundaria [Muñoz & Serrano., 1995]. Esta predicción concuerda con los trabajos experimentales que mostraban que la ProT $\alpha$  nativa se mantiene como una cadena no plegada [Gast *et al.*, 1995; Uversky *et al.*, 1999]. Por lo tanto, se concluyó que la interacción CBP-ProT $\alpha$  estaba mediada a través de regiones acídicas extendidas de la ProT $\alpha$ .

Evidencias experimentales muestran que la sobreexpresión de la ProT $\alpha$  potencia la actividad de transcripción de promotores dependientes de CBP como TRE y NF- $\kappa$ B; sin embargo, otro blanco de CBP, el promotor del gen de la clase II de MHC [Kretsovali *et al.*, 1998], no se ve afectado por la ProT $\alpha$  (lo que indica que otros factores adicionales, el estado de la cromatina del promotor y/o la composición del complejo coactivador están implicados en el mecanismo) [Karetsou *et al.*, 2002].

Se ha postulado que el efecto de la ProT $\alpha$  en la transcripción podría ser ejercido sobre el estado de la cromatina del promotor o sobre la actividad enzimática de CBP, que está directamente involucrado en la activación de la transcripción [Martínez-Balbas *et al.*, 1998]. Al demostrarse en ensayos de actividad acetiltransferasa *in vitro* usando las histonas del octámero como sustrato que la actividad de CBP no era afectada por la ProT $\alpha$ , se ha apuntado que la cromatina es el posible blanco de la función de esta

proteína. La ProT $\alpha$  podría interactuar con regiones promotoras mediadas por CBP y seguidamente promover la reorganización de H1 o el desplazamiento dirigido al desensamblaje de la fibra compacta de cromatina de 30nm [Karetsou *et al.*, 1998]; también evitaría el reordenamiento de H1 y mantendría la conformación de la cromatina parcialmente extendida, estado necesario para el paso de la RNA polimerasa II.

### ***iii. Interacción de la protimosina $\alpha$ con la acetiltransferasa de histonas p300***

Se ha encontrado que la acetiltransferasa de histonas p300, una proteína con gran homología a CBP, se une a la ProT $\alpha$  a través de su región C-terminal [Cotter & Robertson., 2000] colocalizando en dominios subnucleares discretos, y sugiriendo la implicación de ésta última en la regulación de la transcripción y la acetilación de histonas. Además, algunos trabajos han confirmado que la ProT $\alpha$  se concentra en dominios nucleares que se superponen o engloban a sitios de transcripción activa [Vareli *et al.*, 2000].

La interacción de la ProT $\alpha$  con la acetiltransferasa p300 fue confirmada mediante ensayos de coimmunoprecipitación [Subramanian *et al.*, 2002]. Esta interacción y la actividad de acetilación resultante está a su vez regulada por la interacción de los complejos ProT $\alpha$ -p300 con el antígeno nuclear 3C del Epstein-Barr virus (EBNA3C) [Cotter & Robertson., 2000]. Cuando EBNA3C es reclutado por estas proteínas, la actividad mediada por p300 y el complejo general de activación de la transcripción son modulados por el desplazamiento de componentes específicos y/o la modificación del tamaño de este complejo. Además, se ha demostrado que la ProT $\alpha$  y EBNA3C interactúan con p300 específicamente en regiones idénticas a las de unión de otras proteínas reguladoras de la transcripción con esta acetiltransferasa: como E1A, E6, c-jun y E2F [Shikama *et al.*, 2000].

En base a estos datos se ha propuesto que la ProT $\alpha$  participaría en la decondensación de la cromatina y la acetilación de las histonas del octámero, resultando en la activación de la transcripción [Subramanian *et al.*, 2002].

**iv. Interacción de la protimosina  $\alpha$  con el represor del receptor de estrógeno**

La ProT $\alpha$  puede potenciar específicamente la activación de la transcripción mediada por el receptor de estrógeno eliminando el represor REA y favoreciendo el reclutamiento del coactivador SRC-1 [Martini *et al.*, 2000]. Ya que el receptor de estrógeno es dependiente de CBP [Wang *et al.*, 2001], no debe ser desecheda la posibilidad de que la ProT $\alpha$  pueda proveer al receptor de elevadas concentraciones de CBP y SRC-1. De acuerdo con estos resultados, se ha concluido que la ProT $\alpha$  no interactúa directamente con este receptor, pero modula la actividad de su complejo activador.

**v. Asociación de la protimosina  $\alpha$  con la oncoproteína SET e implicación en la descondensación de la cromatina**

La oncoproteína SET (también denominada TAF-I $\beta$ , PHAPII, I $_2$ <sup>PP2A</sup>) ha sido identificada como una proteína de interacción con la ProT $\alpha$  [Karetsou *et al.*, 2004]. SET pertenece a una familia conservada de chaperonas de histonas (factores de ensamblaje de nucleosomas, NAP $_5$ ) que median en el transporte y almacenaje de histonas, en el ensamblado de nucleosomas y en la descondensación de la cromatina espermática; y posee una larga secuencia poliacídica en su extremo C-terminal. Trabajos de varios autores han indicado que SET se une a histonas, remodela la estructura de la cromatina [Nagata *et al.*, 1995; Okuwaki *et al.*, 1998] e inhibe la acetilación de las histonas como componente del complejo INHAT [Seo *et al.*, 2001].

Se ha propuesto que la interacción entre SET y la ProT $\alpha$  podría estar promovida y/o estabilizada *in vivo* por CBP. Como ya se ha señalado anteriormente, CBP es una proteína multifuncional que interactúa con una gran variedad de factores de transcripción [Bannister & Kouzarides., 1996], y además se ha detectado que se une de forma directa con SET. Estos autores indican que CBP podría existir en el complejo ProT $\alpha$ /SET actuando como una molécula puente entre estas proteínas ácidas, las cuales regularían la estructura de la cromatina.

SET posee actividad descondensadora de la cromatina [Matsumoto *et al.*, 1999], y la ProT $\alpha$  es capaz de desensamblar *in vitro* cromatina de esperma humano con una eficacia comparable a la de SET [Karetsou *et al.*, 2004]; de acuerdo con estos datos, estas proteínas podrían ser reclutadas en los promotores génicos para descondensar las fibras de cromatina compactada en células de mamíferos. La presencia de la ProT $\alpha$  y SET en estos promotores contribuiría a la desorganización del ensamblaje de cromatina (paso obligatorio para muchos procesos dependientes de DNA [Horn & Peterson., 2002]) a través de la interacción con elementos que estabilizan la compactación de las fibras, como la histona H1 o el octámero de histonas, y modulando la actividad de CBP, necesaria para los eventos de descondensación en otros muchos sistemas [Horn & Peterson., 2002].

**vi. Interacción de la protimosina  $\alpha$  con el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3)**

STAT3 es un factor de transcripción activado por muchas citoquinas (hormona de crecimiento, IL-6, factor de crecimiento epidérmico, etc) y ha sido implicado en la inducción de la progresión del ciclo celular y en la prevención de la apoptosis [Battle & Frank, 2002; Bromberg & Darnell, 2000; Yang *et al.*, 1998]. Este factor, tras ser fosforilado en residuos de tirosina en respuesta a los interferones de tipo I [Boulton *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1996], se dimeriza y es traslocado desde el citoplasma al interior del núcleo celular, en donde funciona coordinadamente con otros coactivadores transcripcionales y factores de transcripción para iniciar y regular la expresión de genes implicados en la proliferación celular (ciclina D1, c-myc) [Turkson & Jove., 2000; Bromberg & Darnell, 2000; Bromberg *et al.*, 1999].

Aunque la activación de este factor de transcripción provoca su redistribución en el núcleo de la célula, STAT3 parece no contener en su secuencia una señal de migración nuclear. De este modo, se ha relacionado la interacción de la ProT $\alpha$  (que posee una potente señal de localización nuclear) y esta proteína con un mecanismo responsable de la traslocación del complejo ProT $\alpha$ -STAT3 desde el citoplasma al núcleo de las células de mamíferos [Yang *et al.*, 2004], proceso dependiente de la fosforilación de STAT3 en su extremo N-terminal inducida por el interferón  $\alpha$ .

**vii. Interacción de la protimosina  $\alpha$  con proteínas de la replicación celular**

Los experimentos realizados en nuestro laboratorio han indicado que la ProT $\alpha$  interacciona con las proteínas PCNA, Cdk2 y la ciclina A [Freire *et al.*, 2001]. Una propiedad muy interesante de estas proteínas separadas mediante cromatografía de afinidad sobre ProT $\alpha$ -Sepharosa en extractos de células NC37 es que se comportan como un complejo multiproteico que contiene además a las histonas H2A, H2B, H3 y H4, proteínas de transporte nuclear como la carioferina  $\beta_1$ , Rch-1, Ran, y RCC1 (y en bajas concentraciones la proteína NTF2, la nucleoporina p62, y la Hsp70), y otras proteínas que controlan el ciclo celular como cdc2, Cdk4, y la ciclina B (también en niveles muy bajos). La bien documentada implicación de la proteína PCNA [Kelman *et al.*, 1997] y de Cdk2 y la ciclina A [Fang & Newport, 1991; Cardoso *et al.*, 1993] en la replicación del DNA sugieren la posibilidad de que la ProT $\alpha$  pueda estar implicada en la actividad de replicación de la cromatina y en el control del ciclo celular.

**viii. Protimosina  $\alpha$  y tumorigénesis**

Se ha demostrado que la expresión heteróloga de la ProT $\alpha$  en fibroblastos de roedores es suficiente para inducir *in vitro* la transformación de esas células [Orre *et al.*, 2001], caracterizada por el incremento de la proliferación, el crecimiento independiente de anclaje, la desaparición de la inhibición por contacto y la disminución de la dependencia de suero de las células transfectadas.

De forma similar a otras oncoproteínas y factores de transcripción, la ProT $\alpha$  es sobreexpresada en una gran variedad de líneas celulares o tejidos tumorales, incluyendo colon [Shiwa *et al.*, 2003], hígado [Wu *et al.*, 1997], pecho [Domínguez *et al.*, 1993; Magdalena *et al.*, 2000], pulmón [Sasaki *et al.*, 2001a], estómago [Leys *et al.*, 2007], ovario [Hapke *et al.*, 2003], tiroides [Letsas *et al.*, 2005; Kashat *et al.*, 2010] y neuroblastoma humano [Sasaki *et al.*, 2001b], sugiriendo una implicación fundamental en la tumorigénesis.

Por otra parte, la ProT $\alpha$  interactúa con CBP y estimula la transcripción dependiente de los factores AP1 y NF- $\kappa$ B, estando éste último relacionado con la transformación celular y la inducción de la tumorigénesis [Shishodia & Aggarwal, 2004].

En conclusión, la capacidad de la ProTα para interactuar, ya sea directamente o a través de mediadores, con una gran variedad de proteínas implicadas en actividades relacionadas con la cromatina, refuerza la hipótesis de que está involucrada en el remodelado de la cromatina. En otras palabras, la ProTα puede participar en el proceso de ensamblaje y desensamblaje de los nucleosomas que ocurre durante la transcripción, replicación, recombinación y reparación de la cromatina.

### 6.3. PROTIMOSINA α Y APOPTOSIS

La apoptosis es la forma dominante de muerte celular programada durante el desarrollo embrionario, el recambio de tejidos y la respuesta celular al estrés. Este proceso se caracteriza por una variedad de cambios morfológicos, que incluyen la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática, la contracción celular, la condensación de la cromatina y la fragmentación del DNA cromosómico.

La activación de las proteasas específicas (caspasas) que participan en el mecanismo molecular de la apoptosis se produce por dos rutas principales en las células de los mamíferos: la vía extrínseca o de receptores de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial [revisado en Hengartner *et al.*, 2000].

La vía extrínseca comprende miembros de la familia de los receptores de muerte (como CD95, la proteína Fas o el receptor del factor de necrosis tumoral) que reciben señales proapoptóticas desde el exterior celular y reclutan y activan a la caspasa iniciadora 8, mediante moléculas adaptadoras como FADD.

La vía intrínseca es activada en respuesta a señales extracelulares o estímulos internos como daños en el DNA [revisado en Rich *et al.*, 2000] y se caracteriza por la liberación citoplasmática de moléculas, principalmente citocromo c, desde la mitocondria [Goldstein *et al.*, 2000; Wang, 2001]. El citocromo c liberado se asocia con el factor 1 de activación de proteasas apoptóticas (Apaf-1) y la procaspasa 9 formando un complejo heptámerico de activación denominado apoptosoma [Acehan *et al.*, 2002; Jiang & Wang, 2000].



Los factores más importantes relacionados con la apoptosis pueden ser divididos en dos grupos: a) factores de transcripción que inducen apoptosis como E2F-1 [Qin *et al.*, 1994], c-myc [Zindy *et al.*, 1998], p53 [Vogelstein *et al.*, 2000], c-Jun [Crocker *et al.*, 2001] y AFX [Tang *et al.*, 2002]; b) proteínas que previenen la apoptosis como STAT3 [Stephanou *et al.*, 2000], STAT5 [Socolovsky *et al.*, 2001] y la ProTα [Jiang *et al.*, 2003].

En este sentido, se ha demostrado que la inhibición de la expresión y la síntesis de la ProTα mediante oligonucleótidos antisentido y RNAs interferentes induce la apoptosis en varios tipos celulares [Jiang *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 1999] o acelera el proceso apoptótico después del tratamiento con inductores de la apoptosis como la actinomicina D o el etopósido [Wu *et al.*, 2011]. Además, otros estudios han señalado la activación de la expresión del gen de la ProTα en fases tempranas de inducción apoptótica en células T [Wang *et al.*, 2000].

***i. Inhibición de la activación de la caspasa 3 mediante el bloqueo de la formación del apoptosoma mediado por la protimosina α***

La liberación del citocromo c desde la mitocondria al citosol marca un momento definido en la respuesta de las células de mamíferos a una variedad de estímulos apoptóticos, en la cual la transferencia normal de electrones en la cadena de transporte mitocondrial es interrumpida y las caspasas son activadas [Goldstein *et al.*, 2000; Wang, 2001]. El citocromo c liberado se une al factor 1 de activación de proteasas apoptóticas (Apaf-1) e induce un cambio conformacional que permite la asociación estable del deoxiadenosín trifosfato/adenosín trifosfato (dATP/ATP) a Apaf-1. Este evento dirige a la formación de un heptámero Apaf-1-citocromo c: el apoptosoma [Jiang & Wang., 2000; Acehan *et al.*, 2002]. El apoptosoma recluta y activa a la procaspasa 9, la cual a su vez activa a las caspasas 3, 6 y 7 [Rodríguez & Lazebnik., 1999]. Estas caspasas degradan muchos sustratos intracelulares provocando, finalmente, la muerte celular [Thomberry & Lazebnik., 1998].

La ruta mitocondrial de activación de las caspasas está estrechamente regulada, y la liberación de citocromo c desde la mitocondria es un proceso controlado por la familia de proteínas Bcl-2 [Adams & Cory., 1998; Chao & Korsmeyer., 1998]. Las moléculas inhibidoras de la apoptosis (IAP) también regulan esta ruta mediante inhibición directa

de la actividad caspasa [Wang, 2001; Deveraux & Reed., 1999]. La acción de las proteínas IAP es antagonizada por proteínas mitocondriales como Smac/Diablo y Omi/HtrA2 después de la liberación de estas al citoplasma [Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2001; Hegde *et al.*, 2002].

Varios estudios han determinado la influencia de la ProTα en la regulación de la formación del apoptosoma y en su actividad [Jiang *et al.*, 2003]. El análisis de la formación del apoptosoma en extractos de células HeLa permitió purificar una actividad inhibitoria e identificarla como la oncoproteína ProTα. En presencia de esta proteína la formación del apoptosoma era eficientemente bloqueada y, además, la ProTα inhibía la actividad de la caspasa 3 cuando se incluía en las mezclas de reacción. Por lo tanto, estos resultados indican que la ProTα inhibe la activación de la caspasa 3 mediante el bloqueo de la formación del apoptosoma [Jiang *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2010].

Por otro lado, cuando las células HeLa eran tratadas con RNA interferente contra la ProTα y se irradiaban con luz UV mostraban un rango mayor de apoptosis, y se observaba una actividad de la caspasa 3 más elevada [Jiang *et al.*, 2003]. En contraste, células U2OS transfectadas para sobreexpresar la ProTα e irradiadas con luz UV presentaban un menor porcentaje de morfología apoptótica y de actividad de la caspasa 3 respecto a las células control no transfectadas [Qi *et al.*, 2010].

Los resultados de este estudio indican que una de las funciones bioquímicas de la ProTα es prevenir la formación del apoptosoma, lo cual es consistente con su función de oncoproteína requerida para la proliferación celular [Dosil *et al.*, 1993; Orre *et al.*, 2001; Sburlati *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1993; Rodríguez *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1997; Eilers *et al.*, 1991]. De forma similar, otros reguladores negativos de la apoptosis como Bcl-2 [Adams & Cory., 1998; Chao & Korsmeyer., 1998] y las IAPs [Deveraux & Reed., 1999] han mostrado también actividades oncogénicas.

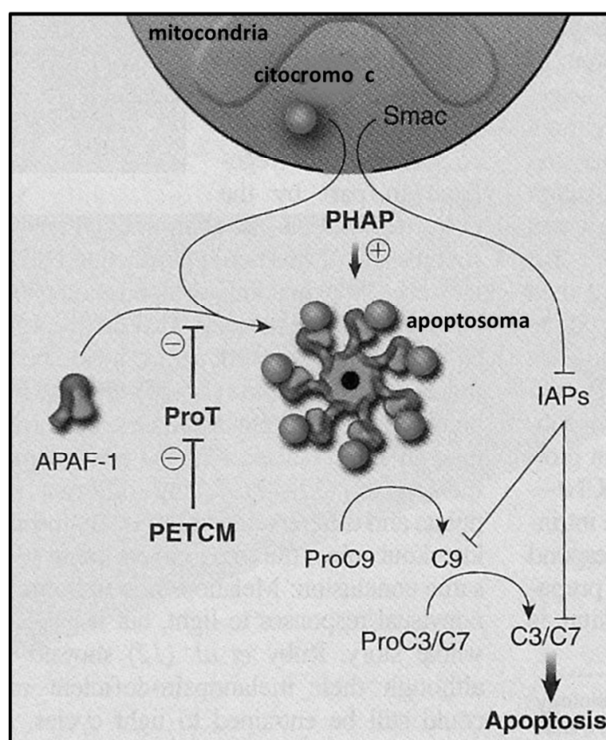


Figura 6. La protimosina  $\alpha$  inhibe la activación de las caspasas en las células apoptóticas mediante el bloqueo de la formación del apoptosoma [Jiang *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2010].

Sin embargo, el mecanismo bioquímico antiapoptótico de la ProT $\alpha$  no está claro; aunque se ha descubierto que la mayoría del dATP requerido para la activación eficaz de la caspasa 3 *in vitro*, mediante la formación del apoptosoma, es probablemente usado para reprimir la actividad de la ProT $\alpha$  en células HeLa [Jiang *et al.*, 2003].

Estudios posteriores han indicado que la actividad del apoptosoma requiere la hidrólisis del dATP y su recambio [Qi *et al.*, 2010], lo que indica que la vía mitocondrial de la apoptosis está regulada por los niveles celulares de ATP. Durante la apoptosis, Apaf-1 emplea el dATP como cofactor, y el citocromo c unido a Apaf-1 induce la hidrólisis del nucleótido a dADP (que es inmediatamente reemplazado por dATP exógeno). Considerando que la ProT $\alpha$  y Apaf-1 interactúan *in vitro*, estos autores han sugerido la posibilidad de que la ProT $\alpha$  interaccione con el dominio de unión a ATP de este factor o induzca un cambio conformacional en el mismo que impida la unión del dATP con Apaf-1 [Qi *et al.*, 2010].

Por otra parte, la expresión de la ProT $\alpha$  es inhibida por p53 [Zhao *et al.*, 2000], un factor que induce apoptosis mediada principalmente a través de la ruta Bcl-2/Bax por activación del gen *bax* [Selvakumaran *et al.*, 1994]. Ya que se ha demostrado la correlación directa entre la expresión de la ProT $\alpha$  y Bcl-2, un factor de supervivencia

que inhibe la formación del apoptosoma bloqueando la liberación de citocromo c desde la mitocondria [Kluck *et al.*, 1997], se ha propuesto que la ProT $\alpha$  puede promover la supervivencia celular a través de la ruta antiapoptótica de Bcl-2 [Letsas *et al.*, 2005]. Además, la asociación de la ProT $\alpha$  con la proteína antiapoptótica STAT3 podría indicar un programa anti-apoptótico diferente que implicaría la activación transcripcional de la proteína Bcl-xl [Battle & Frank, 2002; Yang *et al.*, 2004].

Finalmente, se ha propuesto que la ProT $\alpha$ , a través de su interacción con CBP, realizaría su actividad antiapoptótica estimulando la transcripción del factor NF- $\kappa$ B. Este factor puede inducir la expresión de proteínas que inhiben la apoptosis como TRAF, IAPs o proteínas de la familia Bcl-2 [Bui *et al.*, 2001; Shishodia *et al.*, 2002].

## **ii. Regulación de la apoptosis mediante el complejo p8/protimosina $\alpha$**

La ProT $\alpha$  y p8 son dos pequeñas proteínas sin estructura secundaria estable en solución y que muestran carga electrostática opuesta a pH neutro. Así, varios estudios han demostrado que interactúan entre ellas y parecen promover una estabilización mutua de sus estructuras en una conformación particular, resultando en un complejo envuelto en la regulación de la apoptosis [Malicet *et al.*, 2006].

Se han encontrado otros casos de proteínas desorganizadas estructuralmente que adquieren una configuración estable después de su unión a una molécula correcta, como algunos factores de transcripción eucarióticos que presentan una región básica larga no estructurada y que pueden organizarse en una conformación helicoidal después de su asociación al DNA [Weiss *et al.*, 1990; Encinar *et al.*, 2001].

La interacción entre p8 y la ProT $\alpha$  fue confirmada mediante ensayos de co-inmunoprecipitación en células 293T. Sorprendentemente, ni el extremo N-terminal ni el C-terminal de la ProT $\alpha$  muestran interacción con p8, indicando que la unión requiere de la mayor parte, sino toda, de la secuencia de la ProT $\alpha$ . Además, ensayos de fluorescencia y la espectroscopía NMR han mostrado que la unión de p8 a esta proteína está mediada por regiones de residuos de tirosina en la secuencia de p8 [Malicet *et al.*, 2006].

Además, se ha demostrado que la eliminación celular de la ProTα o p8 mediante el empleo de sus RNAs interferentes correspondientes y el tratamiento con estaurosporina resulta en un gran incremento de la actividad de las caspasas 3, 7 y 9. Sin embargo, la sobreexpresión de la ProTα o p8 provoca una moderada disminución de las actividades de las caspasas 3 y 7. Además, estas actividades fueron fuertemente inhibidas cuando p8 y la ProTα se sobreexpresaron concomitantemente, y el número de núcleos apoptóticos disminuyó [Malicet *et al.*, 2006].

Estos resultados sugieren que cada una de estas proteínas es indispensable para el mecanismo de inhibición de la apoptosis y que se requiere la formación de un complejo heterodimérico para ejercer dicha actividad.

### ***iii. Actividad antiapoptótica de la protimosina α regulada por la proteína HuR***

Durante la respuesta celular al estrés genotóxico que puede conducir a la muerte celular programada, ciertas proteínas que participan en la supervivencia celular, regulan la apoptosis o controlan la reparación de macromoléculas dañadas continuando sintetizándose [Kaufman, 2002].

La proteína HuR ha sido caracterizada como una proteína de unión a RNA (RBP), perteneciente a la familia Hu/ELAV, que participa en el transporte, estabilización y potenciación de la traducción de los mRNAs transcritos durante la expresión génica (*c-fos*, *p21*, *c-myc*, *p27*, *p53*, etc) de respuesta al estrés [Millard *et al.*, 2000; Brennan & Steitz, 2001; Lal *et al.*, 2004; Gorospe, 2003].

En este sentido, se ha encontrado que, bajo estímulos apoptóticos, la proteína HuR se asocia con el mRNA de la ProTα y lo protege de la degradación en el citoplasma, dirigiéndolo a los ribosomas y potenciando su traducción [Lal *et al.*, 2004, 2005].

Así, en células HeLa tratadas con luz UV como estímulo apoptótico, la movilización del mRNA de la ProTα al citoplasma y su asociación con la proteína HuR se incrementan de forma dramática. Además, la concentración citoplasmática y la traducción de la ProTα durante la apoptosis aumenta considerablemente en células que sobreexpresan la proteína HuR [Lal *et al.*, 2005]. Por lo tanto, estos resultados demuestran una asociación molecular y funcional entre la expresión y los efectos antiapoptóticos de la

ProTα y la proteína HuR, incidiendo en que la función inhibitoria de esta última sobre la apoptosis depende de la potenciación de la expresión y traducción de la ProTα.

Este mecanismo de regulación post-transcripcional constituiría un programa de supervivencia alternativo al implementar la actividad antiapoptótica de la ProTα como bloqueante del ensamblaje del apoptosoma [Jiang *et al.*, 2003].

#### **iv. La protimosina α y SET como reguladores de la apoptosis**

La proteína SET es un componente del complejo INHAT, que regula la modificación de las histonas y la transcripción génica y tiene una función inhibitoria sobre p300/CBP y PCAF [Seo *et al.*, 2001]. Aparte de estas propiedades de interacción con las histonas y su participación en el ensamblaje de nucleosomas, SET modula la función nuclear de HuR, una proteína de unión a RNA implicada en el transporte y estabilidad de mRNAs [Brennan *et al.*, 2000], y en la traducción y concentración citosólica del mRNA de la ProTα en condiciones apoptóticas [Lal *et al.*, 2005].

Además, SET y la ProTα son oncoproteínas de distribución nuclear-citoplasmática que presentan actividad antiapoptótica: se ha descrito que SET inhibe la actividad DNasa en la apoptosis inducida por Granzima A (que provoca daño independiente de caspasas en el DNA y se caracteriza por cortes de cadena simple) [Fan *et al.*, 2003], mientras que la ProTα parece estar involucrada en la inhibición de la activación de la caspasa 3 por el apoptosoma [Jiang *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2010].

Estos estudios apuntan, por lo tanto, a una función de la ProTα y de SET relacionada con la regulación de la apoptosis.

#### **v. Fragmentación de la protimosina α en apoptosis**

Algunos autores han presentado evidencias de que la ProTα está sujeta a una fragmentación mediada por la caspasa 3 como consecuencia de la progresión de la apoptosis [Evstafieva *et al.*, 2000; Enkemann *et al.*, 2000b]. El corte en el extremo C-terminal de la proteína rompe su señal de localización nuclear y resulta en un derivado truncado (1-99) de la ProTα que carece de la capacidad de acumularse en el núcleo y aparece distribuido dentro de la célula.

Sin embargo, el citoplasma celular no parece ser el punto final de la relocalización de la ProTα truncada (tProTα). Ensayos inmunológicos han mostrado una ruta en células apoptóticas que dirige la externalización de la tProTα [Evstafieva *et al.*, 2003]. De esta manera, la ProTα (fragmento 1-99) parece ser un marcador de superficie específico de células apoptóticas. Estos autores afirman también que no deben excluirse otros procesos proteolíticos del fragmento de ProTα en su ruta hacia el exterior de la membrana celular, ya que el corte por caspasas es un proceso conocido para los precursores de secreción de la Interleuquina 1β y 18 (caspasa 1) [Kuida *et al.*, 1995; Ghayur *et al.*, 1997], de la interleuquina 16 (caspasa 3) [Zhang *et al.*, 1998] y de EMAP II, una citoquina inflamatoria reclutadora de macrófagos (caspasa 7) [Knies *et al.*, 1998; Shalak *et al.*, 2001]. No obstante, permanece sin establecerse si el marcaje de superficie mediado por caspasa de las células apoptóticas con el derivado de la ProTα tiene función fisiológica, aunque se ha especulado que ciertas poblaciones de macrófagos podrían usar el fragmento externalizado de la ProTα, solo o asociado con otras proteínas, como una señal fagocítica [Evstafieva *et al.*, 2003].

Además, se ha demostrado que la producción ectópica de la ProTα y sus fragmentos derivados (con distribución nuclear o nuclear-citoplasmática) protege a las células HeLa de la apoptosis inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF).

Aunque otra función diferente se ha sugerido también para los derivados truncados de la ProTα: así, en fases tardías de la apoptosis, la tProTα cargada negativamente interactuaría con el citocromo c de carga positiva formando un complejo que anularía las propiedades antioxidantes de este citocromo y su función como transportador de electrones entre la membrana externa e interna de la mitocondria [Markova *et al.*, 2003]. Este mecanismo parece ser dependiente de los niveles de tProTα en el citosol y ocurrir a bajas concentraciones; a elevadas concentraciones se ha especulado que la tProTα participaría en la inhibición de la apoptosis.

No obstante, la fragmentación de la ProTα mediada por la caspasa 3 ha sido descrita únicamente en células HeLa, varias horas después del inicio del proceso apoptótico [Evstafieva *et al.*, 2003], y, además, en nuestro laboratorio no se ha observado este tipo de proteólisis en linfocitos (datos no publicados).

Estos resultados, junto con la observación de que el tratamiento celular con oligonucleótidos antisentido de la ProTα es capaz de inducir apoptosis [Rodríguez *et al.*, 1999], sugieren que la eliminación de la ProTα de forma natural (mediante fragmentación por caspasas) o artificial (por arresto de la traducción de su mRNA) puede inducir el paso de las células de la proliferación a la apoptosis. Por lo tanto, los elevados niveles de producción de la ProTα en células cancerosas podrían no solo mantener el estado proliferativo celular sino también proteger a estas células de la entrada en la ruta de muerte celular programada.

En este sentido, la figura 7 representa las principales rutas de división y apoptosis celular en las que se ha descrito la participación de la ProTα.

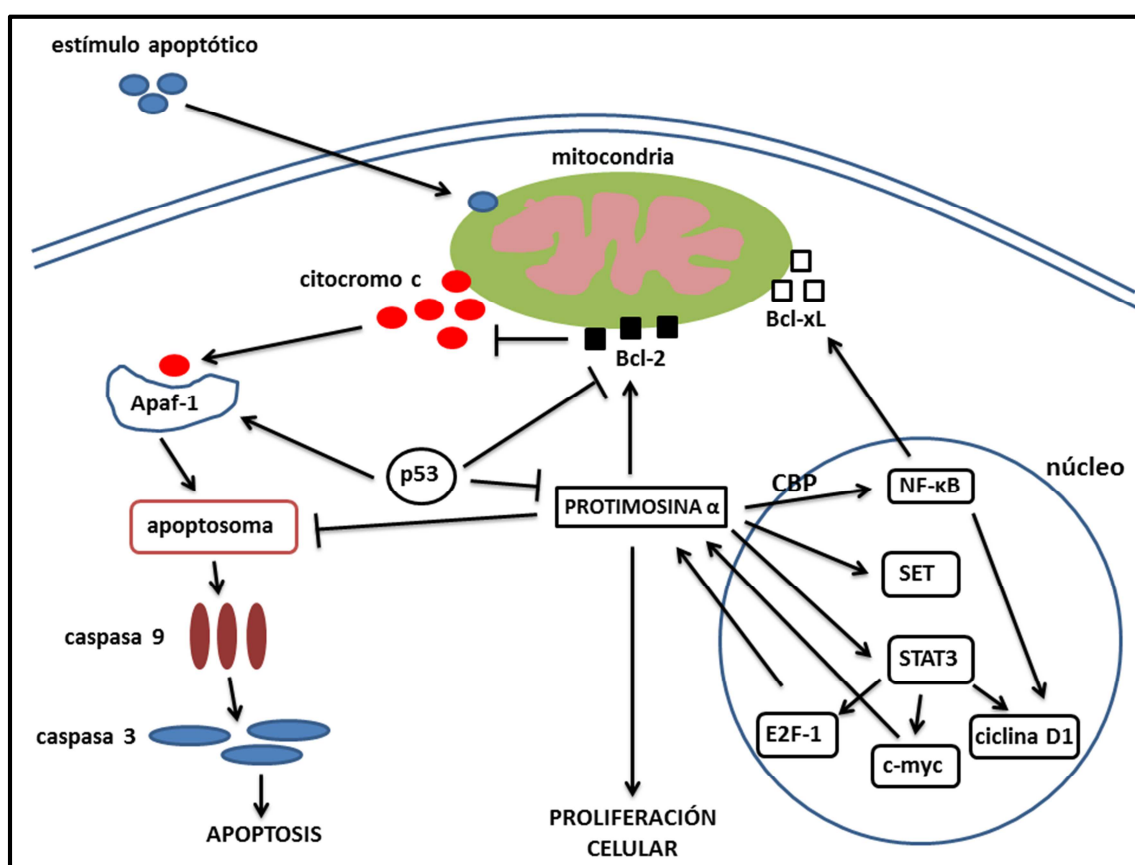


Figura 7. Modelo selectivo de las proteínas que regulan o son reguladas por la ProTα implicadas en rutas de proliferación, supervivencia y apoptosis celular [adaptado de Letsas & Lazaridis., 2006].



#### 6.4. PROTIMOSINA $\alpha$ Y ESTRÉS OXIDATIVO

Las células animales contrarrestan el estrés oxidativo mediante la expresión coordinada de una batería de genes que codifican enzimas detoxificantes y proteínas antioxidantes [revisado en Hayes & McMahon, 2001]. La expresión de estos genes es activada por el factor de transcripción Nrf2, que reconoce sus regiones reguladoras (elementos de respuesta antioxidante, ARES) [Rushmore *et al.*, 1991; McMahon *et al.*, 2001; Kensler *et al.*, 2007].

Un punto central en la regulación de Nrf2 lo constituye su interacción con el inhibidor Keap1, que previene la migración nuclear de este factor de transcripción e induce su ubiquitinación y degradación proteosómica [Kang *et al.*, 2004; McMahon *et al.*, 2003; Zhang & Hannink, 2003; Kobayashi *et al.*, 2006; Kaspar *et al.*, 2009]. La inducción del estrés oxidativo provoca la desestabilización de la unión Nrf2-Keap1, probablemente por modificaciones post-traduccionales de sus constituyentes (fosforilación por la PKC o PERK), permitiendo la liberación de Nrf2 para la activación de genes citoprotectores [Huang *et al.*, 2002; Cullinan & Diehl, 2006; McMahon *et al.*, 2003; Zhang & Hannink, 2003; Bloom & Jaiswal, 2003].

Se ha demostrado que la ProT $\alpha$  interactúa con Keap1 de forma específica (*in vitro* e *in vivo*) uniéndose a su extremo C-terminal, compitiendo con Nrf2 y provocando el desplazamiento de este factor de transcripción [Karapetian *et al.*, 2005; Padmanabhan *et al.*, 2008; Cino *et al.*, 2011; Hancock *et al.*, 2012]. Estos resultados atribuyen a la ProT $\alpha$  el papel de disociador intranuclear del complejo Nrf2-Keap1 [revisado en Stepkowski & Kruszewski., 2011], que se encuentra en movimiento constante entre el citoplasma y el núcleo celular. La liberación de Nrf2 producida por la unión de la ProT $\alpha$  a este complejo es parcial en células no estresadas, provocando un nivel basal de transcripción, y está más pronunciada en células en las que se ha inducido estrés debido a la predestabilización del complejo por modificaciones covalentes que facilitarían la disociación.

Terminado el estímulo de estrés oxidativo, el exceso de Nrf2 libre es retirado del núcleo por Keap1, porque la disociación del complejo estable (no modificado) Nrf2-

Keap1 mediada por la ProTα se vuelve ineficiente de nuevo. Así, este mecanismo finalizaría la inducción de la expresión de genes protectores frente al estrés celular.

Por otra parte, se ha sugerido que la ProTα potencia la respuesta de Nrf2 mediante el incremento de la transcripción de la proteína p21 dependiente de p53 [Kobayashi *et al.*, 2006]. La proteína p21 interviene en la regulación del ciclo celular y la apoptosis: media el arresto celular en la fase G<sub>1</sub>-S, permitiendo procesos de supervivencia como la reparación del DNA. En el citoplasma celular, la proteína p21 se une a Nrf2 compitiendo con Keap1, atenuando la ubiquitinación e induciendo la estabilización de este factor de transcripción [Chen *et al.*, 2009].

#### 6.5. PROTEOLISIS DE LA PROTIMOSINA α

Cuando la ProTα fue aislada en 1984 de extractos de timo preparados en condiciones en las cuales la actividad proteolítica había sido prevenida, la Tα<sub>1</sub> y la Tα<sub>11</sub> no eran detectadas en la separación de los extractos mediante HPLC de fase reversa. Este hecho hizo que algunos autores sugiriesen que la presencia de las timosinas α derivadas de la ProTα en la TF5 era un artefacto resultante de la proteólisis incontrolada durante su preparación. En contraste, experimentos realizados en nuestro laboratorio usando isoelectroenfoque han indicado que la Tα<sub>1</sub> está en realidad presente en extractos de este tipo de diversos tejidos de mamíferos [Franco *et al.*, 1992; Freire *et al.*, 1985] (figura 3A).

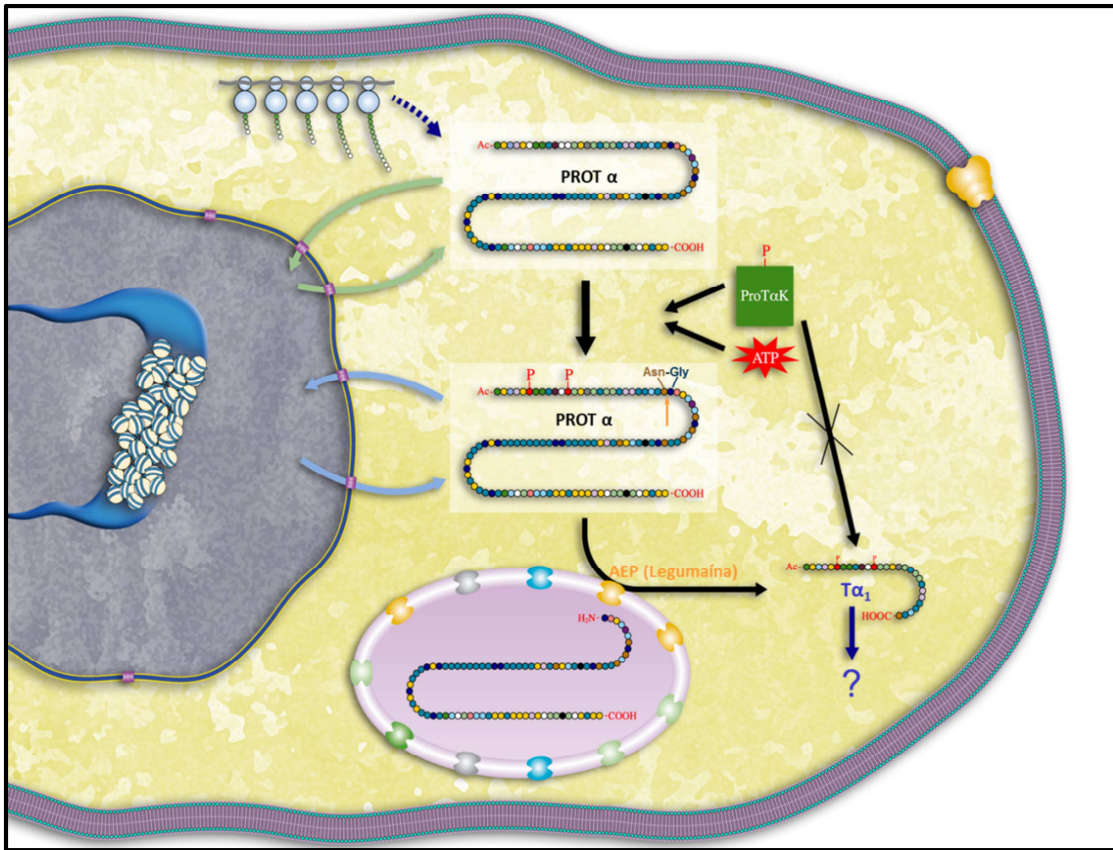
La proteasa capaz de procesar de forma específica la ProTα para generar la Tα<sub>1</sub> fue caracterizada más tarde en nuestro laboratorio como la enzima legumaína ligada a la membrana de los lisosomas [Sarandeses *et al.*, 2003]. Esta enzima fue descubierta en mamíferos a finales de los años noventa [Chen *et al.*, 1997], aunque ya se conocía previamente en plantas [Hara-Nishimura *et al.*, 1993] e invertebrados [Klinkert *et al.*, 1989]. La legumaína de mamíferos muestra elevada especificidad por un tipo de enlaces de asparagina [Dando *et al.*, 1999]: concretamente, *in vitro*, la enzima únicamente corta en la secuencia de la ProTα enlaces Asn-Glu en posición 28-29 (Tα<sub>1</sub>) y 35-36 (Tα<sub>11</sub>).

Este hallazgo es consistente con los resultados que indican la presencia natural de la  $T\alpha_1$  en diferentes tejidos animales [Franco *et al.*, 1992], aunque el significado biológico del procesamiento de la ProT $\alpha$  y la presencia celular de la  $T\alpha_1$  es desconocido.

A juzgar por el análisis de las timosinas  $\alpha$  en extractos celulares preparados en condiciones de drástica inhibición de la proteólisis, esta proteasa muestra incluso una especificidad mayor *in vivo*, ya que solo la  $T\alpha_1$  era detectada, a una concentración similar a la de ProT $\alpha$ , mientras que no se detectaba  $T\alpha_{11}$  (en concordancia con estudios previos en tejidos de mamíferos) [Franco *et al.*, 1992]. Sin embargo, no puede desecharse la posibilidad de que la aparente ausencia de  $T\alpha_{11}$  sea debida a la rápida degradación de este péptido *in vivo* (la no detección del fragmento 29-109 o 36-109 de la ProT $\alpha$  en extractos celulares es presumiblemente indicativa también de su rápida degradación *in vivo*). Así, la presencia de  $T\alpha_{11}$  a bajas concentraciones en la fracción de timo de ternera TF5 [Caldarella *et al.*, 1983] podría deberse a las características del método usado para su preparación.

Las características del procesamiento *in vivo* de la ProT $\alpha$  sugieren que es realizado también por la legumaína. A la luz de estos resultados, los fallos previos en la detección de  $T\alpha_1$  en extractos preparados bajo condiciones drásticas de desnaturalización [Haritos *et al.*, 1984a] puede ser atribuido a su anómalo comportamiento cromatográfico en esas condiciones debido a su tendencia a agregarse, como evidencian otros estudios [Franco *et al.*, 1992; Freire *et al.*, 1985].

La amplia distribución de la  $T\alpha_1$  [Franco *et al.*, 1992] y de la legumaína [Chen *et al.*, 1997] en diferentes tejidos sugiere que el procesamiento de la ProT $\alpha$  que origina  $T\alpha_1$  es un proceso general en células de mamíferos. Además, tejidos que muestran una elevada actividad de la legumaína como los linfoides [Chen *et al.*, 1997; Manoury *et al.*, 1998] poseen unos elevados niveles de  $T\alpha_1$ . La estructura primaria altamente conservada de la ProT $\alpha$  [revisado Freire *et al.*, 2002], especialmente alrededor de los enlaces de asparagina/glicina que corta la legumaína, proporciona argumentos que apoyan la visión de la proteólisis de la ProT $\alpha$  como un proceso generalizado.



**Figura 8. Procesamiento proteolítico de la ProTα a Tα<sub>1</sub> mediado por una endopeptidasa lisosomal: la enzima legumina.**

Sin embargo, no está claro si el procesamiento de la ProTα por la legumina es un simple paso en su catabolismo o si tiene algún significado biológico. La legumina muestra una estricta especificidad por un grupo restringido de enlaces de asparagina, lo que ciertamente sugiere que es improbable que contribuya al catabolismo general de proteínas, pero sí su participación en procesos específicos de proteínas [Dando *et al.*, 1999]. En este sentido, se ha identificado como una proteasa clave en el procesamiento del antígeno MHC de clase II [Manoury *et al.*, 1998]. Estas consideraciones apoyan la teoría de que la proteólisis de la ProTα en linfocitos y otras células de mamíferos es un mecanismo selectivo y no una degradación inespecífica. Además, el hecho de que la Tα<sub>1</sub> esté presente en elevados niveles, similares a los de la ProTα, indica que puede tener una función biológica. La localización citosólica de la Tα<sub>1</sub>, su demostrada incapacidad para migrar al núcleo [Manrow *et al.*, 1991], y su carencia de señal secretora [Eschenfeldt *et al.*, 1989] argumentan una función intracelular no nuclear para esta proteína, que puede estar relacionada o no con la ProTα.

Finalmente, cabe destacar que el procesamiento proteolítico de la ProT $\alpha$  descrito en células HeLa apoptóticas [Evstafieva *et al.*, 2000, 2003; Enkemann *et al.*, 2000] no ha sido confirmado en otros tipos celulares sometidos a apoptosis, y sucede en un contexto biológico enteramente diferente (muerte celular programada) a la generación de T $\alpha_1$  en células proliferantes o no proliferantes.

## 6.6. LA FOSFORILACIÓN DE LA PROT $\alpha$

### i. Fosforilación de la protimosina $\alpha$ y proliferación celular

Al igual que lo que ocurre con otras proteínas ácidas nucleares que enlazan histonas y que están implicadas en la organización estructural de la cromatina, a inicios de los años 90 se demostró en experimentos realizados en nuestro laboratorio que la ProT $\alpha$  era fosforilada *in vitro* por la caseína quinasa-2 (CK-2) [Barcia *et al.*, 1992] en residuos de Ser y Thr localizados en su región N-terminal (aminoácidos 1-14 de su secuencia).

Más tarde, se encontró que la ProT $\alpha$  también resultaba fosforilada *in vivo*, en un grado dependiente de la actividad proliferativa de la célula [Barcia *et al.*, 1993]. De hecho, la fosforilación de la ProT $\alpha$  era particularmente notable en linfocitos de bazo activados mitóticamente, en comparación con linfocitos y otros tipos celulares no activados para proliferar [Barcia *et al.*, 1993; Sburlati *et al.*, 1993]. Pero, a diferencia de lo que ocurría *in vitro*, en timocitos, esplenocitos y células HeLa únicamente se fosforilaba en residuos de Thr localizados en la secuencia de sus primeros 14 aminoácidos [Barcia *et al.*, 1993]. Esta diferencia parecía indicar que la CK-2 podría no ser la responsable de la fosforilación de la ProT $\alpha$  en las poblaciones celulares investigadas, sugiriendo que la ProT $\alpha$  es fosforilada por otra quinasa.

En posteriores trabajos de nuestro laboratorio se aisló esta proteína quinasa en extractos de esplenocitos de ratón activados para proliferar [Pérez-Estévez *et al.*, 1997]. Esta proteína (ProT $\alpha$ K), a diferencia de la CK-2, fosforilaba a la ProT $\alpha$  en los mismos residuos de Thr que resultaban fosforilados *in vivo* [Pérez-Estévez *et al.*, 1997], tal como se indica en la figura 9. Estos resultados confirmaron los hallazgos previos

sobre la fosforilación de la ProTα *in vivo* [Barcia *et al.*, 1993] y, al mismo tiempo, indicaron que esta ProTαK podría ser la responsable de la fosforilación observada en las células de mamíferos.

Además, se confirmó que los niveles más elevados de actividad fosforilante de la ProTα se encontraban en los extractos citosólicos. En este sentido, aunque la ProTα es fosforilada por la ProTαK y por la CK-2, sólo la primera era separada mediante cromatografía de afinidad sobre ProTα-Sepharosa en los extractos citosólicos de varios tipos celulares estudiados [Pérez-Estévez *et al.*, 1997], en los cuales ambas enzimas estaban presentes con niveles similares de actividad.

Los datos de este estudio, particularmente la afinidad de la ProTαK por la ProTα unida a Sepharosa, y los resultados del análisis de fosfoaminoácidos de la ProTα fosforilada *in vivo* e *in vitro* por la ProTαK purificada, reforzaron la hipótesis de que esta enzima podría ser la responsable de la actividad fosforilante sobre la ProTα observada *in vivo*.

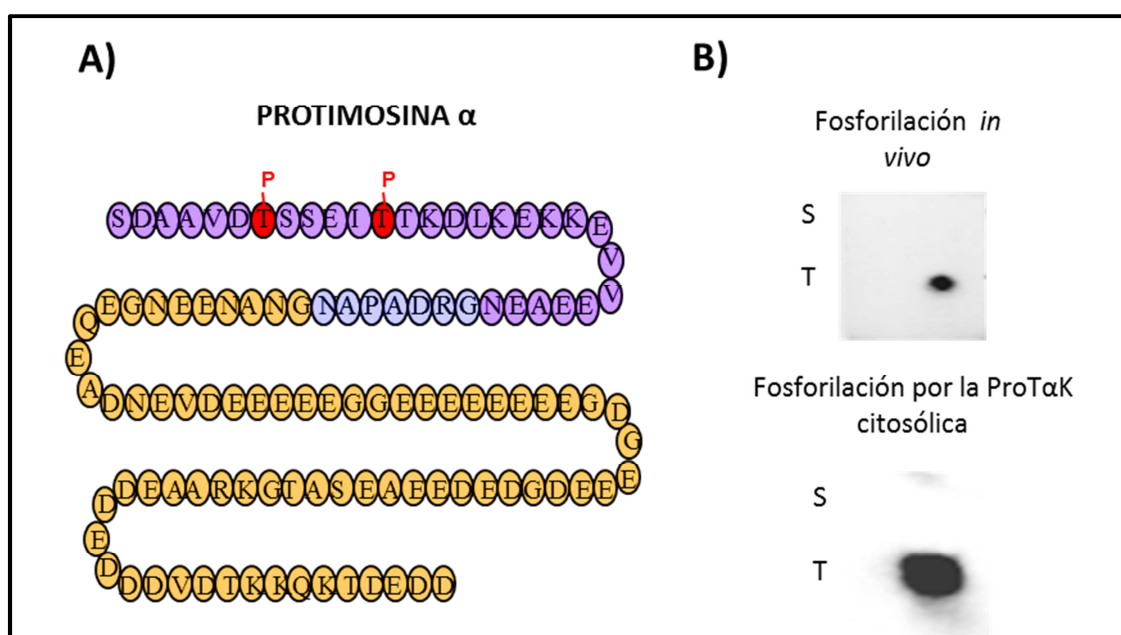


Figura 9. Identificación de los lugares de fosforilación de la ProTαK en la secuencia de la Protimosina α [Pérez-Estévez *et al.*, 1997].

**ii. Caracterización de la enzima quinasa responsable de la fosforilación de la protimosina  $\alpha$  en células en proliferación.**

*a. Caracterización preliminar de la proteína quinasa de la protimosina  $\alpha$*

Dado que la ProT $\alpha$ K citosólica fosforila a la ProT $\alpha$  en lugares de su secuencia que coinciden con las secuencias consenso de fosforilación de la CK-2 [Pinna *et al.*, 1990], en nuestro laboratorio investigamos el comportamiento de la ProT $\alpha$ K con sustratos y efectores de la CK-2.

La respuesta de la ProT $\alpha$ K citosólica a los reguladores de la CK-2 es bastante similar a la de esta enzima: es intensamente inhibida por la heparina y activada de forma 4 veces superior por la protamina y poli-lisina [Pérez-Estévez *et al.*, 1997]. Además, la enzima usa ATP ( $K_m$  de 55  $\mu$ M) como donador de fosfato.

Teniendo en cuenta sus sitios de fosforilación y la dependencia de poliaminas para su actividad, la ProT $\alpha$ K recuerda a las enzimas de la familia de la CK-2. Sin embargo, presenta muchas diferencias: la ProT $\alpha$ K citosólica no fosforila a la caseína ni a un sustrato artificial de la CK-2 [Pérez-Estévez *et al.* 1997], y tampoco utiliza GTP como donador de fosfato. Asimismo, experimentos de inmunosupresión con anticuerpos contra la subunidad  $\alpha$  de la CK-2 no bloqueaban la actividad de la ProT $\alpha$ K [Pérez-Estévez *et al.*, 1997].

Los estudios realizados para investigar con mayor profundidad las similitudes y diferencias entre la ProT $\alpha$ K y las caseín quinasas, ensayando el efecto de cationes divalentes (activadores de las caseín quinasas, aunque con un requerimiento variable [Lasa *et al.*, 1997]), determinaron que el  $\text{Ca}^{+2}$  no tiene efecto en la actividad de la ProT $\alpha$ K, mientras que el  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  y el  $\text{Co}^{+2}$  poseen efectos activadores similares a concentraciones 5 mM [Pérez-Estévez *et al.*, 2000]. A concentraciones mayores (no fisiológicas), el  $\text{Mn}^{+2}$  es un activador más efectivo y el  $\text{Mg}^{+2}$  tiene un efecto inhibitorio. Este patrón es diferente al observado para las caseín quinasas y corrobora que las propiedades catalíticas de estas enzimas son distintas de las de la ProT $\alpha$ K.

Por otra parte, los datos de filtración en gel de la actividad ProT $\alpha$ K citosólica indican que la enzima tiene una masa molecular de 180 kDa; y el análisis SDS-PAGE de la

enzima separada mediante HPLC señala que la actividad quinasa parece residir en una proteína de 60-64 kDa [Pérez-Estévez *et al.*, 1997]. Estos resultados sugieren que la enzima forma una estructura oligomérica *in vivo*.

*b. Sustratos y especificidad de la ProTαK*

Para identificar otros posibles sustratos de la ProTαK, en nuestro laboratorio se investigó si esta enzima era capaz de fosforilar: a) a proteínas de las fracciones citosólicas y nucleares de linfocitos de bazo, y (b) a proteínas de las fracciones citosólicas y nucleares de linfocitos de bazo que muestran afinidad por la ProTα-Sepharosa.

Los estudios de actividad quinasa *in vitro* empleando la histona H1 y las histonas del octámero de células de timo de ternera como sustratos indicaron que las histonas H2B y H3 eran fosforiladas por la ProTαK, aunque con una actividad de fosforilación entre 2- 4.5 veces menor respecto a la ProTα [Pérez-Estévez *et al.*, 1997]. Sin embargo, su patrón de fosforilación no se asemeja al encontrado para las quinasas que fosforilan histonas, las cuales son dependientes de AMP<sub>c</sub> y GMP<sub>c</sub> [Hill *et al.*, 1990]. Estos resultados parecen demostrar que la ProTα es el sustrato celular principal de la ProTαK purificada.

La capacidad de la ProTαK para fosforilar los péptidos derivados de la ProTα (la Tα<sub>1</sub> y la Tα<sub>11</sub>) también fue investigada, ya que los sitios de fosforilación de la ProTα se incluyen en su secuencia. Sin embargo, la ProTαK no los fosforila *in vitro* [Pérez-Estévez *et al.*, 2000], mientras que la CK-2 fosforila a la Tα<sub>1</sub> y a la Tα<sub>11</sub> [Barcia *et al.*, 1992].

Concordando con estos datos, los niveles de Tα<sub>1</sub> y Tα<sub>11</sub> fosforiladas *in vivo* son mucho menores que los de la ProTα fosforilada y también mucho menores que los niveles totales de ambos péptidos en la célula [Pérez-Estévez *et al.* 2000].

*c. Actividad de la proteína quinasa de la protimosina α en diferentes tipos celulares*

El estudio de fraccionados subcelulares obtenidos de hepatocitos y de timocitos activados mitóticamente (ambos de ratón), de cultivos subconfluentes de células HeLa y de células NC37 demostró que presentaban actividad ProTαK en los componentes



con elevada afinidad a la ProT $\alpha$ ; siendo esta actividad mayoritaria en las fracciones citosólicas de los tipos celulares analizados [Pérez-Estévez *et al.*, 1997].

Confirmando resultados anteriores de nuestro laboratorio, la actividad ProT $\alpha$ K en las fracciones citosólicas de estos tipos celulares parecía ser dependiente de la actividad proliferativa de las células: células con una actividad moderada de proliferación (hepatocitos, timocitos activados y células HeLa subconfluentes) mostraban una actividad quinasa correspondiente al 26-40% de la observada en esplenocitos activados mitogénicamente; mientras que la actividad ProT $\alpha$ K de los extractos de células NC37 se sitúa en el rango de la de estos esplenocitos. Además, los timocitos no estimulados y células HeLa confluentes poseen una actividad ProT $\alpha$ K despreciable.

Finalmente, las quinasas citosólicas de estos tipos celulares mostraban la misma especificidad de fosforilación para la ProT $\alpha$  que la enzima de esplenocitos.

*d. Fosforilación de la protimosina  $\alpha$  por la ProT $\alpha$ K en células activadas para proliferar*

Los estudios realizados para elucidar la base molecular de la dependencia de la actividad fosforilante sobre la ProT $\alpha$  con la proliferación celular centraron su investigación en el proceso de fosforilación de esta proteína en diferentes fases del ciclo celular. De igual modo, se estudió también la influencia de la exposición de las células a efectores específicos de proteínas quinasas que tienen una importante función en las rutas de señalización reguladoras de la actividad proliferativa.

Así, la activación mitótica de linfocitos de bazo resulta en un incremento en la cantidad de [ $^{32}$ P]ortofosfato incorporado en la ProT $\alpha$  [Barcia *et al.*, 1993] y un incremento paralelo en la actividad *in vitro* de la ProT $\alpha$ K presente en las fracciones citosólicas de estas células [Pérez-Estévez *et al.*, 1997]. En estudios posteriores [Pérez-Estévez *et al.*, 2000] se analizó la actividad ProT $\alpha$ K en fraccionados subcelulares de células NC37 sincronizadas en diferentes fases del ciclo celular ( $G_0$ ,  $G_1$ ,  $G_1$ -S,  $G_2$ ), encontrándose que la actividad ProT $\alpha$ K se eleva durante la fase temprana S, permanece en niveles elevados durante la fase S y comienza a declinar cuando la célula entra en fase  $G_2$ . En todas las fases, la actividad ProT $\alpha$ K predominante se localiza en la fracción citosólica.

Los cambios en el ciclo celular son paralelos a los cambios en la expresión génica de la ProTα en células en proliferación [Bustelo *et al.*, 1991; Vareli *et al.*, 1996].

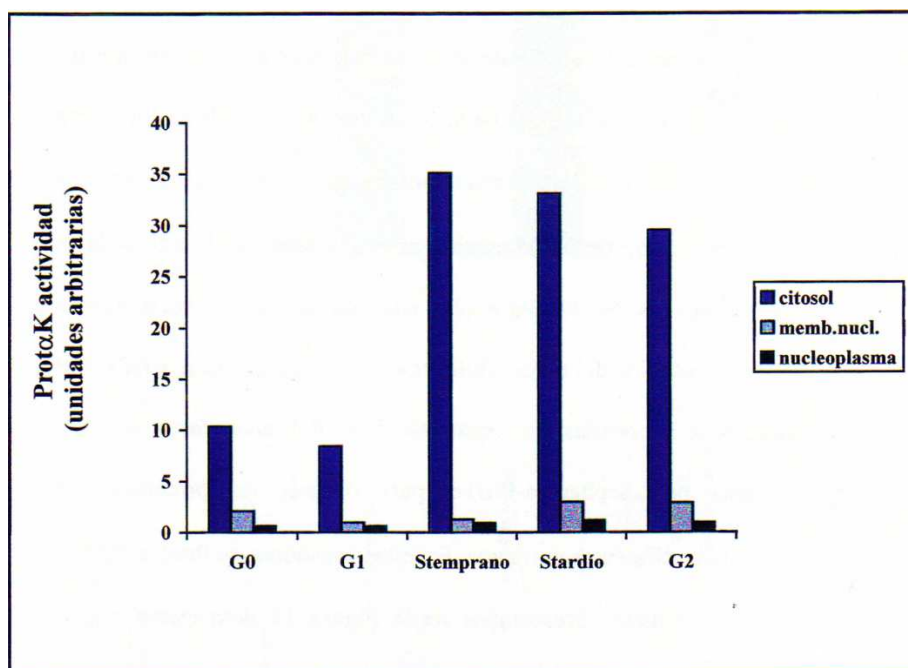


Figura 10. Evolución de la actividad ProTαK a lo largo del ciclo celular en fraccionados subcelulares de células NC37 sincronizadas [Pérez-Estévez *et al.*, 2000].

La relación entre la fosforilación de la ProTα y la activación mitogénica sugiere que puede estar implicada en rutas de señalización celular y asociada a circuitos que controlan el crecimiento celular. Se ha determinado la actividad ProTαK y los niveles de fosforilación de la ProTα en células bajo los efectos de inhibidores específicos de otras proteínas quinasas (PKC, PKA y MAP) con funciones conocidas en eventos de fosforilación relacionados con la proliferación. Únicamente los inhibidores de la PKC tienen un efecto apreciable en la incorporación de [<sup>32</sup>P]ortofosfato en la ProTα (cuando los linfocitos son activados con ConA e IL-2) [Pérez-Estévez *et al.*, 2000]. Sin embargo, ninguno de estos inhibidores afecta a la actividad de la ProTαK *in vitro*.

Estos datos indican que la fosforilación de la ProTα en linfocitos de bazo activados mitóticamente puede estar modulada por la actividad de la PKC e inducida por la ruta de señalización de esta quinasa.



**iii. Actividad ProTαK y significado biológico de la fosforilación de la protimosina α en la célula**

La amplia distribución de la ProTα en las células de mamíferos, con una elevada concentración, indica una función central en la proliferación celular; por lo que es bastante razonable teorizar la existencia de una quinasa específica para esta proteína. Además, sus características sugieren que la ProTαK purificada no se incluye en las categorías principales descritas de proteínas quinasas [Pearson & Kemp, 1991].

La fosforilación de la ProTα parece tener un significado biológico, por lo menos en células en proliferación, por dos motivos principalmente: la existencia de esta proteína quinasa altamente específica y la elevada concentración de la ProTα fosforilada en estas células (cerca del 18% de las moléculas de ProTα están fosforiladas en linfocitos de bazo de ratón estimulados mitogénicamente). De igual modo, la relación directa entre la actividad de la ProTαK y la concentración de fosfo-ProTα en células en proliferación [Pérez-Estévez *et al.*, 2000; Barcia *et al.*, 1993] apoyan una función con significado biológico.

Los efectos de esta fosforilación en el comportamiento celular de la ProTα son desconocidos. Así, se ha demostrado que la capacidad de la ProTα para interactuar con las histonas y permitir el ensamblado de los nucleosomas *in vitro* [Díaz-Jullien *et al.*, 1996; Covelo *et al.*, 2006] no parece estar afectada por su fosforilación. Además, se ha indicado que el proceso de proteólisis *in vitro* es independiente del estado de fosforilación de la ProTα; aunque la presencia de la Tα<sub>1</sub> fosforilada en células en proliferación y la incapacidad de la proteína quinasa de la ProTα para fosforilar a la Tα<sub>1</sub> [Pérez-Estévez *et al.*, 2000] parecen indicar que la ProTα procesada *in vivo* debe ser previamente fosforilada para originar Tα<sub>1</sub> fosforilada.

Aunque no debe desecharse la posibilidad de que la fosforilación de la ProTα afecte a su interacción *in vivo* con las histonas o con otras macromoléculas en la célula, parece probable que dicha fosforilación esté implicada en otros aspectos de la función de la ProTα: como su actividad de regulación de la transcripción o su efecto antiapoptótico. En este sentido, la ProTα podría estar incluida en el grupo de proteínas cuya actividad nuclear está regulada mediante fosforilación [Jans *et al.*, 1991].

Claramente, la caracterización estructural y bioquímica de la ProT $\alpha$ K que fosforila a la ProT $\alpha$  en células en proliferación es muy importante para elucidar los efectos de dicha fosforilación en el comportamiento de la ProT $\alpha$  y para esclarecer la función de esta proteína.

En este sentido, los procedimientos y ensayos experimentales llevados a cabo en el laboratorio de investigación en Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela dirigido por el profesor D. Manuel Freire Rama y presentados en esta Tesis Doctoral han resultado en la inesperada identificación de la ProT $\alpha$ K como la isoforma M2 de la enzima piruvato quinasa (EC.2.1.7.40) [Díaz-Jullien *et al.*, 2011].



**CONOCIMIENTO ACTUAL DE LA  
BIOLOGÍA DE LA PROTIMOSINA  $\alpha$   
Y OBJETIVOS**





## II. CONOCIMIENTO ACTUAL DE LA BIOLOGÍA DE LA PROTAMOSINA $\alpha$ Y OBJETIVOS

Según se deduce de lo expuesto en la *Introducción* y en relación a la función biológica de la ProT $\alpha$ , las evidencias actuales indican que se trata de una proteína multifuncional. Los datos experimentales demuestran que participa de forma esencial en la división celular, migrando al núcleo celular e influenciando la actividad de la cromatina. Específicamente, se ha demostrado que afecta al proceso de transcripción mediante interacciones con factores de transcripción [Cotter *et al.*, 2000; Subramanian *et al.*, 2002; Karetsou *et al.*, 2002, 2004; Martini *et al.*, 2000] y con las histonas [Díaz-Jullien *et al.*, 1996; Karetsou *et al.*, 1998; Gómez-Márquez & Rodríguez, 1998]. Los resultados previos en nuestro laboratorio [Covelo *et al.*, 2006] indican que la ProT $\alpha$  interactúa con las histonas del octámero y con un complejo nuclear que contiene actividades acetiltransferasa y metiltransferasa de las histonas H3 y H4, reforzando la teoría de una función nuclear de esta proteína en células en proliferación. Aunque estas investigaciones demuestran la habilidad de la ProT $\alpha$  para cooperar en el ensamblaje de los nucleosomas *in vitro*, para promover la descondensación de los cromosomas y para unir proteínas modificadoras de histonas y otras proteínas relacionadas con la actividad de la cromatina, el mecanismo de asociación y de actuación de la ProT $\alpha$  sobre la organización estructural de la cromatina permanece sin aclarar.

Además de las evidencias de la función nuclear de la ProT $\alpha$ , recientemente se han encontrado también actividades citoplasmáticas para esta proteína. La función citosólica más importante de la ProT $\alpha$  consistiría en su actividad antiapoptótica, inhibiendo la activación de la caspasa 3 mediante un mecanismo desconocido [Jiang *et al.*, 2003] que parece implicar la interacción con el apoptosoma [Qi *et al.*, 2010] y en el que podría estar involucrada la proteína p8 [Malicet *et al.*, 2006]. Sin embargo, la

especificación de las rutas de supervivencia celular e inhibición de la apoptosis en las que está implicada la ProT $\alpha$  se desconoce.

Otra importante cuestión que continúa sin resolverse es el significado biológico del procesamiento proteolítico descrito en nuestro laboratorio para la ProT $\alpha$  y mediado por una proteasa lisosomal específica que genera T $\alpha_1$  [Sarandeses *et al.*, 2003], péptido presente de forma natural en los tejidos de mamíferos a una concentración similar a la de la ProT $\alpha$ . Todavía debe elucidarse si la presencia estable de la T $\alpha_1$  en la célula refleja una función independiente de esta proteína o indica la simple degradación celular de la ProT $\alpha$ .

La fosforilación citosólica de la ProT $\alpha$  también proporciona indicios adicionales de su función biológica. Esta fosforilación, que ocurre en residuos de treonina, es un proceso dependiente de la proliferación celular [Barcia *et al.*, 1993], pero su trascendencia biológica no está clara. Los sitios de fosforilación están localizados en secuencias consenso para la CK-2 situadas en el extremo N-terminal (14 primeros a.a.) de la ProT $\alpha$ . De hecho, en nuestro laboratorio encontramos anteriormente que la CK-2 es capaz de fosforilar a la ProT $\alpha$  *in vitro* [Barcia *et al.*, 1992]. Más tarde, aislamos de varios tipos celulares una proteína quinasa citoplasmática que designamos ProT $\alpha$ K y cuyas propiedades indican que es la enzima específica responsable de la fosforilación de la ProT $\alpha$  en las células proliferantes [Pérez-Estévez *et al.*, 1997]. Los estudios de esta proteína quinasa [Pérez-Estévez *et al.*, 1997, 2000], aislada de esplenocitos murinos, determinan que posee una masa molecular de 180 kDa y que su actividad parece corresponderse con un único tipo de subunidades de 60 kDa. Además, fosforila a la ProT $\alpha$  en residuos de treonina localizados en posición 7 y 12 o 13, siendo el patrón de fosforilación obtenido *in vitro* idéntico al observado *in vivo*. Por otro lado, una propiedad destacable de esta quinasa la constituye su incapacidad para fosforilar a la T $\alpha_1$  y a la T $\alpha_{11}$ , aunque ambas contienen en su secuencia los sitios de fosforilación descritos para la ProT $\alpha$ .

De este modo, los lugares específicos de fosforilación de la ProT $\alpha$ K y su incapacidad para fosforilar a la caseína y para utilizar GTP como donador alternativo de grupos fosfato descartan la posibilidad de que la CK-2 sea la enzima responsable de la fosforilación de la ProT $\alpha$ .

La actividad de la ProT $\alpha$ K se correlaciona con la actividad proliferativa de las células: así, durante la progresión del ciclo celular, la ProT $\alpha$ K mantiene su localización citoplasmática y alcanza sus niveles de actividad más elevados en la fase G<sub>1</sub>-S [Pérez-Estévez *et al.*, 2000].

Finalmente, una importante característica de la ProT $\alpha$ K en linfocitos de bazo activados con concanavalina (ConA) e interleuquina-2 (IL-2) es que su actividad está regulada por un proceso de fosforilación incluido en una ruta de señalización dependiente de la actividad de la PKC, aunque esta enzima no fosforila directamente a la ProT $\alpha$ K [Pérez-Estévez *et al.*, 2000].

La existencia de una enzima quinasa específica para la ProT $\alpha$  y la presencia de ProT $\alpha$  fosforilada en células proliferantes indican un importante significado biológico para este proceso de fosforilación [Pérez-Estévez *et al.*, 1997], aunque los efectos sobre el comportamiento celular de la ProT $\alpha$  todavía no han sido determinados.

Así, a pesar de la extensa información disponible sobre las características estructurales de la ProT $\alpha$ , el significado de sus modificaciones post-traduccionales y sus mecanismos de participación en la división celular y en la apoptosis deben de ser todavía aclarados.

Los objetivos de nuestro estudio se incluyen en las investigaciones orientadas a la caracterización de las proteínas que interaccionan con la ProT $\alpha$  en la célula, al diseño de ensayos biológicos para determinar la actividad de la ProT $\alpha$  y a la elucidación del significado de su procesamiento proteolítico para generar T $\alpha_1$ .

La caracterización de las proteínas que interaccionan con la ProT $\alpha$  constituye una herramienta muy importante para profundizar en los mecanismos de su función biológica y es un paso esencial para resolver su actividad bioquímica en la célula. En este sentido, el proyecto de investigación en el que se enmarca esta Tesis Doctoral se planteó con la finalidad de caracterizar e identificar la enzima quinasa aislada en nuestro laboratorio responsable de la fosforilación de la ProT $\alpha$ , y así esclarecer el efecto de este proceso en el comportamiento y función de dicha proteína.

En concreto, los objetivos planteados son los siguientes:

1. La **identificación y la caracterización estructural y bioquímica de la proteína quinasa que fosforila a la ProT $\alpha$**  en células en proliferación.
2. El estudio del **efecto de la fosforilación de la ProT $\alpha$  en su distribución celular y transporte nuclear**.
3. La investigación de la **influencia de la fosforilación de la ProT $\alpha$  en su actividad citosólica antiapoptótica**.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**



### III. MATERIAL Y MÉTODOS

<b>1. MATERIAL BIOLÓGICO.....</b>	<b>69</b>
1.1. Células eucariotas.....	69
1.2. Células procariotas.....	69
1.3. Anticuerpos.....	69
1.4. Otros productos.....	71
<b>2. MATERIAL NO BIOLÓGICO.....</b>	<b>73</b>
2.1. Medios de cultivo.....	73
2.2. Disoluciones y tampones.....	74
2.3. Otros productos.....	75
<b>3. MÉTODOS.....</b>	<b>77</b>
3.1. CULTIVOS CELULARES.....	77
3.1.1. Condiciones de manipulación.....	77
3.1.2. Inicio de los cultivos celulares.....	78
3.1.3. Mantenimiento de los cultivos celulares.....	78
3.1.4. Tripsinización de los cultivos de células 293T y HeLa.....	78
3.1.5. Marcaje metabólico de células NC37 y 293T con [ <sup>32</sup> P]ortofosfato.....	78
3.1.6. Análisis del número y viabilidad celular.....	79
3.2. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES.....	79
3.2.1. Fraccionamiento subcelular de células NC37.....	79
3.2.2. Lisado de células 293T.....	79
3.2.3. Extractos citosólicos de músculo de conejo.....	80

3.3.	ENSAYOS DE ACTIVIDAD QUINASA PROTαK.....	80
3.3.1.	Ensayos de actividad ProTαK y fosforilación de la ProTα.....	80
3.3.2.	Efecto de la FBP, Mn <sup>+2</sup> , L-cisteína, L-alanina y T <sub>3</sub> en la actividad ProTαK.....	81
3.3.3.	Ensayos de actividad ProTαK con PEP como donador de ortofosfato.....	81
3.4.	PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD PROTαK.....	81
3.4.1.	Cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad.....	81
3.4.2.	Separación por SDS-PAGE y ensayos de actividad ProTαK de las bandas renaturalizadas.....	82
3.4.3.	SDS-PAGE de la fracción con actividad ProTαK.....	82
3.5.	ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	83
3.5.1.	Análisis MALDI-TOF/ LS-ESI-IT.....	83
3.5.2.	Identificación de los sitios de fosforilación.....	83
3.6.	PURIFICACIÓN DE LA ISOFORMA M2-PK CON ACTIVIDAD PROTαK Y ACTIVIDAD PK EN CÉLULAS NC37.....	83
3.6.1.	Fraccionamiento secuencial con sulfato amónico y cromatografía de afinidad a ProTα.....	83
3.6.2.	Purificación de las actividades ProTαK y PK.....	84
3.7.	ENSAYOS DE ACTIVIDAD PK.....	84
3.7.1.	Determinación de la actividad PK mediante el método acoplado NADH-LDH.....	84
3.7.2.	Efecto de la FBP, Mn <sup>+2</sup> , L-cisteína, L-alanina y T <sub>3</sub> en la actividad PK.....	85



3.8. VECTORES DE EXPRESIÓN DE LA PROT $\alpha$ Y TRANSFECCIÓN EN CÉLULAS 293T Y HELA.....	85
3.8.1. Vector de expresión: plásmido pcDNA 3.1 His <sub>6</sub> -c-myc.....	85
3.8.2. Inserto: cDNA de la ProT $\alpha$ .....	86
3.8.3. Crecimiento (amplificación) y extracción del plásmido pcDNA 3.1(+) His <sub>6</sub> -c-myc.....	87
3.8.4. Transfección de células 293T y HeLa.....	87
3.8.5. Separación de la ProT $\alpha$ recombinante mediante cromatografía de Níquel-agarosa.....	89
3.9. ENSAYOS INMUNOLÓGICOS.....	90
3.9.1. Purificación de anticuerpos de conejo anti-ProT $\alpha$ por inmunoafinidad.....	90
3.9.2. Análisis por SDS-PAGE e inmunodetección por <i>Western blot</i> de la ProT $\alpha$ .....	91
3.9.3. Análisis por SDS-PAGE e inmunodetección por <i>Western blot</i> de la ProT $\alpha$ K.....	92
3.9.4. Ensayos de inmunosupresión.....	93
3.9.5. Inmunoprecipitación de la ProT $\alpha$ K.....	93
3.9.6. Ensayos de coimmunoprecipitación ProT $\alpha$ -M2 en células NC37 y células 293T transfectadas.....	94
i. Ensayos de coimmunoprecipitación en células NC37.....	94
ii. Ensayos de coimmunoprecipitación en células 293T transfectadas.....	95
3.9.7. Cuantificación de proteínas.....	95
3.10. ANÁLISIS DE FOSFOAMINOÁCIDOS.....	95
3.10.1. Purificación de la proteína M2 fosforilada <i>in vivo</i> .....	95
3.10.2. Hidrólisis y análisis en capa fina.....	96
3.11. ENSAYOS DE DESFOSFORILACIÓN.....	96

3.12. FILTRACIÓN EN GEL.....	96
3.13. ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA Y MICROSCOPÍA CONFOCAL.....	97
3.13.1. Citolocalización de la ProTα endógena y/o la His6-c-myc ProTα (nativa y mutada en Thr7) en células 293T y HeLa transfectadas y sin transfectar.....	97
3.14. ENSAYOS DE ACTIVIDAD APOPTÓTICA.....	98
3.14.1. Inducción apoptótica de cultivos de células 293T transfectadas y no transfectadas mediante incubación con estaurosporina.....	98
3.14.2. Preparación de lisados de células 293T apoptóticas.....	99
3.14.3. Ensayos de actividad caspasa 9 y caspasa 3.....	99

# III. MATERIAL Y MÉTODOS

## 1. MATERIAL BIOLÓGICO

### 1.1. Células eucariotas

**Células NC37:** es una línea celular estable procedente de la transformación de linfocitos B humanos.

**Células 293T:** es una línea celular estable procedente de epitelio de riñón humano, que expresa el antígeno T del virus SV-40.

**Células HeLa:** es una línea celular estable procedente de epitelio de carcinoma de cuello uterino humano.

### 1.2. Células procariotas

**DH5α:** cepa de *E. coli* deficiente en recombinación (*recA*) y endonucleasa deficiente (*endA*).

### 1.3. Anticuerpos

ANTICUERPO	ORIGEN	EPITOPO	APLICACIÓN/ENSAYO	CONCENTRACIÓN
Suero anti -NT- ProTα (Neosystem)	Conejo	Extremo N-terminal de la ProTα (a.a. 1-21)	Detección de la ProTα endógena y recombinante ( <i>Western blot</i> )	d: 1/800
			Inmunoprecipitación de la ProTα endógena y recombinante	45-60 µg/ml
			Citocalización de la ProTα endógena y recombinante (microscopía de inmunofluorescencia)	d: 1/800
Suero anti- CT- ProTα (Neosystem)	Conejo	Extremo C-terminal de la ProTα (a.a. 95-109)	Detección de la ProTα endógena ( <i>Western blot</i> )	d: 1/800
			Inmunoprecipitación de la ProTα endógena	45-60 µg/ml
			Citocalización de la ProTα endógena (microscopía de inmunofluorescencia)	d: 1/800

## Material y Métodos

ANTICUERPO	ORIGEN	EPITOPO	APLICACIÓN/ENSAYO	CONCENTRACIÓN
<b>Anti- NT- ProTα purificado (Neosystem)</b>	Conejo	Extremo N- terminal de la ProTα (a.a. 1-21)	Detección de la ProTα endógena y recombinante ( <i>Western blot</i> )	d: 1/800
			Inmunoprecipitación de la ProTα endógena y recombinante	20 µg/ml
			Citocalización de la ProTα endógena y recombinante (microscopía de inmunofluorescencia)	d: 1/2000
<b>Anti -CT- ProTα purificado (Neosystem)</b>	Conejo	Extremo C- terminal de la ProTα (a.a. 95-109)	Detección de la ProTα endógena ( <i>Western blot</i> )	d: 1/800
			Inmunoprecipitación de la ProTα endógena	20 µg/ml
			Citocalización de la ProTα endógena (microscopía de inmunofluorescencia)	d: 1/2000
<b>Suero anti-M1 (RockLand)</b>	Cabra	Todas las isoformas de la PK	Detección de la M1 y la M2 ( <i>Western blot</i> )	d= 1/5000
			Inmunosupresión de la M1 y la M2	d ≈ 1/4
			Inmunoprecipitación de la M1 y la M2	d= 1/25
<b>Anti- M2 (SheBoBiotech) (monoclonal)</b>	Ratón	M2-PK	Detección de la M2 ( <i>Western blot</i> ) Inmunosupresión de la M2 Inmunoprecipitación de la M2	d=1/5000 60 µg/ml 6 µg/ml
<b>Anti- c-myc (Sigma)</b>	Conejo (purificado por afinidad)	Péptido c- myc (a.a. 410- 419: EQKLISEEDL)	Detección de la ProTα recombinante ( <i>Western blot</i> )	d: 1/2000
			Inmunoprecipitación de la ProTα recombinante	10 µg/ml
			Citocalización de la ProTα recombinante (microscopía de inmunofluorescencia)	d: 1/1000
<b>Anti-His (Sigma) (monoclonal)</b>	Ratón	Péptido His <sub>5</sub>	Detección de la ProTα recombinante ( <i>Western blot</i> )	d: 1/800
<b>Anti-tubulina (Sigma)</b>	Ratón	Subunidad α de la tubulina	Citocalización de la tubulina (microscopía de inmunofluorescencia)	d: 1/2000
<b>Anti-conejo-HRP (2<sup>ario</sup>) (GE Healthcare BioSciences)</b>	Burro	IgG	<i>Western blot</i>	d: 1/5000

ANTICUERPO	ORIGEN	EPITOPO	APLICACIÓN/ENSAYO	CONCENTRACIÓN
<b>Anti-ratón-HRP</b> (2 <sup>ario</sup> ) (GE Healthcare BioSciences)	Oveja	IgG	Western blot	d: 1/5000
<b>Anti-cabra-HRP</b> (2 <sup>ario</sup> ) (Sigma)	Conejo (purificado por afinidad)	IgG	Western blot	d: 1/5000
<b>Anti-conejo -</b> <b>AlexaFluor-488</b> (2 <sup>ario</sup> ) (Invitrogen)	Cabra	Cadena pesada de la IgG	Microscopía de inmunofluorescencia (emisión en verde)	d: 1/5000
<b>Anti-ratón-</b> <b>AlexaFluor-594</b> (2 <sup>ario</sup> ) (Invitrogen)	Cabra	Cadena pesada de la IgG	Microscopía de inmunofluorescencia (emisión en rojo)	d: 1/5000

#### 1.4. Otros productos:

**Lactato deshidrogenasa (L-LDH) (SIGMA):** suministrada a 790-1020 unidades/mg.

**3, 3', 5-triiodo-L-tironina (T3) (SIGMA)**

**Fosfatasa alcalina biotinilada (New England BioLabs):** 1100 unidades/mg.

**Seroalbúmina bovina (BSA) (Merck)**

La **ProTα** fue purificada de timocitos de ternera siguiendo el protocolo descrito por Franco *et al.*, 1992.

El **vector plasmídico pcDNA 3.1(+)** His<sub>6</sub>-c-myc (Invitrogen).

El plásmido pcDNA 3.1(+) His<sub>6</sub>-c-myc es un vector de 5,4 kb derivado del plásmido pcDNA 3.1 diseñado para una elevada estabilidad y para la expresión transitoria en células de mamíferos. Se le ha incorporado el origen de replicación de un fago filamentoso (fagos de DNA monocatenario, ej. f1), y de este modo tiene la capacidad de producir DNA de cadena simple (muy útil para mutagénesis dirigida).

ELEMENTO DE pcDNA 3.1(+)	BENEFICIO/UTILIDAD/CAPACIDAD
<b>Promotor del citomegalovirus (CMV) humano</b>	Permite la expresión eficiente y en altos niveles de la proteína recombinante (bases 232-819)
<b>Promotor T7/ <i>priming site</i></b>	Permite la transcripción <i>in vitro</i> del RNA del inserto (bases 863-882)
<b>Sitio de Clonaje Múltiple (MCS)</b>	Permite la inserción del gen y facilita el clonaje (bases 895-1010)
<b>Señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH)</b>	Eficiencia en la terminación de la transcripción y poliadenilación del mRNA (bases 1028-1252)
<b>Origen f1</b>	Producción de DNA monocatenario por coinfección con el fago f1 (bases 1298-1726)
<b>Origen y promotor temprano de SV40</b>	Expresión del gen de resistencia a neomicina y replicación episomal en células que expresan el antígeno T grande de SV40 (ej. COS-1, COS-7, 293T) (oncoproteína que permite una replicación aumentada al unirse al promotor, ya que funciona como una helicasa que desnaturaliza el DNA para su replicación por la maquinaria de la célula huésped) (bases 1731-2074)
<b>Gen de resistencia a neomicina</b>	Selección de transfectantes estables en células de mamíferos (bases 2136-2930)
<b>Señal de poliadenilación de SV40</b>	Eficiencia en la terminación de la transcripción y poliadenilación del mRNA (bases 3104-3234)
<b>Origen pUC</b>	Replicación y crecimiento en <i>E. coli</i> (bases 3617-4287)
<b>Gen de resistencia a ampicilina (<math>\beta</math>-lactamasa)</b>	Selección del vector en <i>E. coli</i> (bases 4432-5428)

Además, presenta una secuencia codificadora para 6 aminoácidos de histidina (His<sub>6</sub>) y la secuencia correspondiente a los aminoácidos 410-419 del péptido c-myc (EQKLISEEDL), que se expresarían respectivamente en los extremos N-terminal y C-terminal de la proteína recombinante sintetizada (para facilitar posteriores análisis de citolocalización, purificación, separación, etc.).

## 2. MATERIAL NO BIOLÓGICO

### 2.1. Medios de cultivo

Para el cultivo en monocapa de las líneas celulares 293T y HeLa se utilizó medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (*SIGMA*) pH 7.4 que contenía un 0.2% de NaHCO<sub>3</sub>, suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) (*BioWhittaker*), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (*BioWhittaker*).

Para el crecimiento en suspensión de las células NC37 se empleó medio RPMI 1640 pH 7.4 que contenía un 0.2% de NaHCO<sub>3</sub>, suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) (*BioWhittaker*), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (*BioWhittaker*).

El crecimiento de las bacterias *E. coli* transformadas con el plásmido pcDNA 3.1(+) His<sub>6</sub>-c-myc se realizó incubando los inóculos en medio Luria-Bertani (LB) pH 7 suplementado con el antibiótico ampicilina (100 µg/ml) (*SIGMA*). Los cultivos de colonias en medio sólido se realizaron en el mismo medio con 1.5% de bacto-agar (*Scharlau*) y antibiótico a la concentración indicada anteriormente. La composición de estos medios se describe de forma detallada en el manual de protocolos Sambrook *et al.*, 1989.

## 2.2. Disoluciones y tampones

- **PBS:** 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- **TBST-1:** 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 137 mM NaCl y 0.2% Tween-20.
- **TBST-2:** 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 137 mM NaCl y 0.1% Tween-20.
- **Tampón de electroforesis SDS/PAGE 1X (Tris-glicina-SDS):** 25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glicina y 0.1% SDS.
- **Tampón de muestra de Laemmli:** 60 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol y 10% glicerol.
- **Tampón de muestra para DNA (6X):** 0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilenocianol y 30% glicerol.
- **Tampón de transferencia:** 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 380 mM glicina, 0.1% SDS y 20% metanol.
- **Tampón de transferencia de la ProTα:** 20 mM acetato sódico pH 4.5.
- **Tampón Tris-acetato-EDTA (TAE):** 40 mM Tris-acetato y 1 mM EDTA.
- **Tampón de diálisis (tampón A):** 50 mM Tris-HCl pH 7.5 conteniendo 5% glicerol (v/v), 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF y 40 mM NaF.
- **Tampón de diálisis (tampón B):** 10 mM fosfato potásico pH 6, con 2mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM β-mercaptoetanol y 0.2 mM FBP.
- **Tampón de lisis de células NC37:** 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet NP-40.
- **Tampón de lisis de células 293T:** 20 Mm Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% tritón X-100 y 0,5% NP-40.
- **Tampón de lisis de células musculares de ratón:** 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 5 mM MgSO<sub>4</sub> y 1 mM EDTA conteniendo 10 mM β-mercaptoetanol.
- **Tampón de ensayos quinasa ProTαK:** 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM KCl, 1.6 mM EDTA, 1.6 mM EGTA, 26 mM MgCl<sub>2</sub>, 3.3 mM DTT, 83 mM β-glicerofosfato, 5% glicerol y 0.1 mM [<sup>32</sup>P]ATP.
- **Tampón de ensayos de actividad PK:** 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.1 M KCl, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM ADP, 2 mM PEP, 0.5 mM FBP, 0.18 mM β-NADH, y 8 U/ml de L-LDH.



- **Tampón de equilibrado de la columna Níquel-agarosa:** 50 mM fosfato Na pH 8, 0.3 M NaCl.
- **Tampón de elución de la columna de fosfocelulosa (1):** 50 mM Tris-HCl pH 7.5 conteniendo 5% glicerol (v/v), 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 40 mM NaF y 0.6 M NaCl.
- **Tampón de elución de la columna de fosfocelulosa (2):** 70 mM fosfato potásico pH 6, 0.2 mM FBP y 0.5 mM PEP o 0.6 M KCl.
- **Tampón de elución de la columna de afinidad Sepharosa-ProTα:** 50 mM Tris-HCl pH 7.5 conteniendo 5% glicerol (v/v), 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 40 mM NaF y 1 M NaCl.
- **Tampón de inmunoprecipitación de la ProTαK:** 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 75 mM NaCl, 0.5% Nonidet NP-40, 0.2% CHAPS, 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF y 1 µg/ml de leupeptina, pepstatina y aprotinina.
- **Tampón NET:** 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM KCl, 1 mM EDTA y 0.1% Nonidet NP-40.
- **Tampón de electroforesis en capa fina:** 50:5:945 ácido acético/pirimidina/agua, pH 3.5.
- **Tampón de ensayos de desfosforilación:** 50 mM Tris-HCl pH 7.9, 100 mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub> y 0.1 mM ZnCl<sub>2</sub>.
- **Tampón de filtración en gel:** 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, y 0.18% CHAPS.
- **Tampón de ensayos de actividad caspasa 3:** 20 mM HEPES pH 7.4, 20 mM KCl, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% CHAPS y 10 mM DTT.
- **Tampón de ensayos de actividad caspasa 9:** 20 mM HEPES pH 6.5, 20 mM KCl, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% CHAPS y 10 mM DTT.

### 2.3. Otros productos:

i. *GE Healthcare BioSciences:*

**Sal de trietilamonio de adenosina 5'-[γ-<sup>32</sup>P] trifosfato ([γ-<sup>32</sup>P]ATP):** suministrado a una concentración de 3000 Ci/mmol.

**Proteína A-Sepharosa**

ii. SIGMA:

**Fosfoenolpiruvato (PEP)**

**Fructosa 1,6-bisfosfato (FBP)**

**Tripsina-EDTA**, solución al 0.25% (m/v).

**Dinucleótido de nicotinamida y adenina**, en su forma reducida ( **$\beta$ -NADH**).

**Adenosina 5'-difosfato (ADP)**

**Estreptavidina-agarosa**

**Proteína G- agarosa**

**Estaurosporina**: disuelta a una concentración patrón 1 mM en DMSO.

**Tripas de diálisis** con un tamaño de poro de 12.000 Da.

**Ampicilina**: solución patrón 50 mg/ml.

**Poli-L-lisina**: diluida en agua *miliQ* a una concentración 0.1 mg/ml y esterilizada por filtración (0.22  $\mu$ m).

**Divinilsulfona** al 97%.

**Dimetilformamida**

**DAPI**, disuelto en agua *miliQ* (solución patrón 10 mg/ml) y filtrado (0.22  $\mu$ m).

iii. Invitrogen:

**LipofectAMINA 2000**, para la transfección de ácidos nucleicos en células eucariotas.

iv. MP Biomedicals:

**Medio DMEM libre de ortofosfato**

v. Serva:

**Ditiotreitol (DTT)**, disuelto en agua destilada a una concentración patrón 100 mM.

**Leupeptina y pepstatina**: solución patrón 5  $\mu$ g/ $\mu$ l.

**PMSF**: solución patrón 100 mM en isopropanol.

vi. Calbiochem:

**Mowiol 4-88**

vii. Whatman:

**Membranas de nitrocelulosa** de 0.2  $\mu$ m.

viii. *MILLIPORE:*

**Concentradores Amicon** con un límite de exclusión de 10.000 Da.

**Membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF)** de 0.45 µm.

ix. *Merck:*

**Etilendiamina**

**Glutaraldehído**, suministrado al 50%.

x. *BIO-RAD:*

**Agarosa**

**Tritón X-100**

xi. *Pierce Chemical Co.*

**Ninhidrina**

xii. *PerkinElmer*

**[<sup>32</sup>P]ortofosfato**: suministrado como Na<sub>4</sub><sup>32</sup>PO<sub>7</sub> a una concentración de 1-60 Ci/mmol.

## 3. MÉTODOS

### 3.1. CULTIVOS CELULARES

#### 3.1.1. Condiciones de manipulación

La manipulación de las líneas celulares se realizó en condiciones estériles en el interior de una cabina de flujo laminar vertical *TELSTAR BioStar Plus*. Los cultivos se mantuvieron en el interior de un incubador *Heraeus*. El material desechable fue esterilizado en autoclave antes de su eliminación definitiva.

### 3.1.2. Inicio de los cultivos celulares

Los cultivos de células NC37, 293T y HeLa se iniciaron a partir de alícuotas de 1 ml almacenadas en nitrógeno líquido, que habían sido congeladas en un medio compuesto por un 90% de FBS y 10% de DMSO (*SIGMA*) como agente crioprotector. Las alícuotas fueron calentadas en un baño a 37°C, centrifugadas posteriormente a 900 x g durante 5 minutos para retirar el medio de congelación, y resuspendidas a continuación en 5 ml del medio de cultivo correspondiente ( $10^6$  células/ml).

### 3.1.3. Mantenimiento de los cultivos celulares

Las células NC37 fueron cultivadas en botellas *Pyrex* con agitación a 37°C, doblando el volumen del medio de cultivo cada 2 días, proliferando hasta alcanzar una concentración aproximada de  $10^6$  células/ml.

Las células 293T y HeLa se mantuvieron en cultivo en frascos de 25 cm<sup>2</sup> a 37°C en atmósfera humidificada y con un 5% CO<sub>2</sub>; los cultivos fueron tripsinizados periódicamente y divididos en nuevos frascos al alcanzarse la semiconfluencia en la monocapa en crecimiento.

### 3.1.4. Tripsinización de los cultivos de células 293T y HeLa

Las células 293T y HeLa fueron tripsinizadas periódicamente cuando la monocapa en crecimiento alcanzaba un 60-70% de confluencia. Para ello, se eliminó el medio de cada frasco de cultivo y se añadió sobre las monocapas 2 ml de solución 0.25% tripsina-EDTA (*SIGMA*) durante 5 minutos. La solución fue retirada y sustituida por el volumen de medio DMEM necesario para obtener la dilución deseada; y cantidades iguales de células resuspendidas se repartieron en los frascos correspondientes.

### 3.1.5. Marcaje metabólico de células NC37 y 293T con [<sup>32</sup>P]ortofosfato

Para el marcaje metabólico de proteínas con [<sup>32</sup>P]ortofosfato, las células NC37 y 293T fueron incubadas 4 horas en medio DMEM sin ortofosfato y después 14 horas en medio DMEM sin ortofosfato conteniendo 100 µCi/ml de [<sup>32</sup>P]ortofosfato.

### 3.1.6. Análisis del número y viabilidad celular

El recuento del número de células se realizó directamente a partir del cultivo empleando una cámara de Neubauer, y se determinó la viabilidad celular mediante la tinción de la muestra en proporción 1:1 con solución 0.4% azul de tripán (SIGMA).

## 3.2. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES

### 3.2.1. Fraccionamiento subcelular de células NC37

El fraccionamiento subcelular de las células NC37 fue llevado a cabo como describen Freire *et al.*, 2001. Las células fueron recogidas de los cultivos correspondientes, lavadas 2 veces en PBS y resuspendidas ( $5 \times 10^7$  células/ml) en tampón de lisis frío (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet NP-40, 0.5 mM DTT, 5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM PMSF, 5 µg/ml pepstatina y 5 µg/ml leupeptina) durante 10 minutos a 4°C. A continuación, se homogeneizaron en Potter y se centrifugaron a  $2000 \times g$  durante 15 minutos. La fracción citosólica fue obtenida del homogeneizado celular por ultracentrifugación del sobrenadante a  $100.000 \times g$  durante 1 h a 4°C y dializada 24 horas frente a tampón 50 mM Tris-HCl pH 7.5 conteniendo 5% glicerol (v/v), 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, y 40 mM NaF (tampón A).

### 3.2.2. Lisado de células 293T

Las células 293T fueron tripsinizadas cuando alcanzaron una confluencia del 60-70% y resuspendidas en 5 ml de PBS ( $10^6$  células/ml). Se centrifugaron a  $600 \times g$  durante 5 minutos a 4°C y fueron resuspendidas de nuevo en 5 ml de PBS. El PBS sobrenadante fue eliminado por centrifugación y, seguidamente, los *pellets* celulares fueron lisados en tampón frío 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% tritón X-100, 0.5% NP-40, 0.5 mM PMSF, 5 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml pepstatina, 5 µg/ml aprotinina, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  y 2 mM NaF ( $20 \times 10^6$  células/ml); permanecieron 30 minutos a 4°C y se agitaron esporádicamente.

A continuación fue añadida DNAsa 1 a los lisados a una concentración final de 80 µg/ml. Se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente y después se centrifugaron a 12000 x g durante 5 minutos a 4°C. Se recogieron los extractos sobrenadantes y su concentración proteica fue determinada por el método Bradford, tras lo cual fueron congelados a -80°C o procesados inmediatamente.

### **3.2.3. Extractos citosólicos de músculo de conejo**

Los extractos citosólicos de músculo de conejo fueron preparados como describen Imamura & Tanaka, 1982. Brevemente, el músculo esquelético de conejo fue triturado, y homogeneizado en 3 volúmenes de tampón 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 5 mM MgSO<sub>4</sub> y 1 mM EDTA conteniendo 10 mM β-mercaptoetanol. El homogeneizado fue ultracentrifugado y se obtuvo el extracto citosólico crudo, que fue dializado 24 horas en tampón 50 mM Tris-HCl pH 7.5 conteniendo 5% glicerol (v/v), 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF y 40 mM NaF.

## **3.3. ENSAYOS DE ACTIVIDAD QUINASA PROTαK**

### **3.3.1. Ensayos de actividad ProTαK y fosforilación de la ProTα**

Los ensayos de actividad ProTαK en los diferentes extractos o fracciones purificadas fueron realizados según el protocolo descrito por Pérez-Estévez *et al.*, 1997, en tampón de ensayos quinasa (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM KCl, 1.6 mM EDTA, 1.6 mM EGTA, 26 mM MgCl<sub>2</sub>, 3.3 mM DTT, 83 mM β-glicerofosfato, y 5% glicerol) conteniendo 0.1 mM [γ-<sup>32</sup>P]ATP y ProTα de ternera (5 µg) como sustrato. Tras 30 minutos de incubación a 37°C, las mezclas de reacción (25 µl) fueron detenidas añadiendo tampón de muestra Laemmli 2X. Los componentes de las mezclas de reacción fueron analizados mediante electroforesis SDS-PAGE con visualización radiográfica de las bandas de los geles. La fosforilación de la ProTα (actividad quinasa) fue expresada en unidades arbitrarias proporcionalmente a la cantidad de [<sup>32</sup>P] incorporado por dicha proteína, y estimada mediante análisis densitométrico de los impactos radiográficos.

### 3.3.2. Efecto de la FBP, $Mn^{+2}$ , L-cisteína, L-alanina y $T_3$ en la actividad ProT $\alpha$ K

Los efectos de la FBP (0.5, 2, o 5 mM),  $Mn^{+2}$  (5, 10 o 15 mM), L-cisteína (0.05, 0.1 o 0.15 mM), L-alanina (0.5, 1 o 3 mM), o  $T_3$  (0.1, 0.5 o 1  $\mu$ M) en la actividad ProT $\alpha$ K fueron determinados mediante la adición de los respectivos efectores a los extractos a las concentraciones indicadas, seguido de una incubación de 30 minutos a 4°C previa a los ensayos de actividad.

### 3.3.3. Ensayos de actividad ProT $\alpha$ K con PEP como donador de ortofosfato.

La capacidad del PEP para reemplazar al ATP durante la transferencia del ortofosfato a la ProT $\alpha$  fue ensayada mediante la adición de PEP 2 mM a las mezclas de reacción de fosforilación en sustitución del ATP. La generación de piruvato obtenido como resultado de la posible transferencia del ortofosfato desde el PEP a la ProT $\alpha$  fue monitorizada mediante ensayos PK usando el método acoplado NADH-LDH [Bücher & Pfeleiderer, 1955; revisado en Imamura & Tanaka, 1982] (apartado 3.8.1).

## 3.4. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD PROT $\alpha$ K

### 3.4.1. Cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad

Los extractos citosólicos de células NC37 fueron cromatografiados en columnas de fosfocelulosa (a razón de 10 mg de extracto por mililitro de intercambiador iónico) previamente equilibradas con tampón A, y posteriormente lavadas con el mismo tampón conteniendo 0.1 M NaCl. La ProT $\alpha$ K fue eluida con tampón A 0.6 M NaCl.

Las fracciones con actividad ProT $\alpha$ K fueron dializadas contra tampón A 75 mM NaCl y purificadas por cromatografía de afinidad ProT $\alpha$ -Sephara, según el procedimiento descrito por Pérez-Estévez *et al.*, 1997. La ProT $\alpha$  purificada de timo de ternera fue enlazada a Sephara 4B según el procedimiento recomendado por el fabricante (*Pharmacia*) y a una concentración de 1 mg proteína/ml de matriz. La eficacia del acoplamiento, que fue determinada mediante el ensayo colorimétrico de la proteína no ligada [Bradford, 1976], fue siempre superior al 85%. Alícuotas de 15 mg fueron purificadas por cromatografía de afinidad usando 1 ml de ProT $\alpha$ -Sephara, y las

proteínas retenidas fueron eluidas empleando 6 volúmenes de tampón A 1M NaCl, para obtener la fracción de proteínas citoplasmáticas con alta afinidad por la ProTα. Posteriormente, las fracciones con actividad ProTαK se dializaron frente a tampón A y se concentraron mediante centrifugación en concentradores Amicon (límite de exclusión de 10.000 Da) hasta una concentración final 1 mg/ml.

#### **3.4.2. Separación por SDS-PAGE y ensayos de actividad ProTαK de las bandas renaturalizadas**

Alícuotas (200 µg) de la ProTαK purificada mediante cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad fueron separadas mediante SDS-PAGE (geles del 8%). Después de la electroforesis, las proteínas separadas se renaturalizaron siguiendo el método de Hutchcroft *et al.*, 1991, con ligeras modificaciones. Los geles fueron lavados 2 veces (15 minutos cada vez) con 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT y 0.005% Tween-20 y otras 2 veces con tampón de ensayos quinasa. Los geles se cortaron en porciones de 2mm; cada porción fue triturada y las proteínas eluidas 24 horas a 4°C en 50 µl de tampón de ensayos quinasa. La actividad ProTαK fue ensayada de forma separada en cada porción o en combinación de varias de ellas, centrándose el análisis de dicha actividad en extractos de bandas del gel que contenían proteínas situadas en un rango de 60-70 kDa.

#### **3.4.3. SDS-PAGE de la fracción con actividad ProTαK**

Los productos recuperados de las porciones con máxima actividad ProTαK fueron separados de nuevo en geles SDS-poliacrilamida (8%). Para ello, se lavaron las bandas de los geles con H<sub>2</sub>O (15 minutos), se trituraron, se incubaron con tampón de muestra Laemmli 2x durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se incubaron otros 10 minutos a 40°C antes de la electroforesis. Después de la separación, los geles fueron teñidos con plata utilizando el kit *Silver Stain Plus* (BIO-RAD) siguiendo las instrucciones del fabricante.



### 3.5. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

#### 3.5.1. Análisis MALDI-TOF/ LS-ESI-IT

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE y teñidas con plata fueron digeridas con tripsina y analizadas mediante espectrometría de masas de exclusión dinámica MALDI-TOF/LS-ESI-IT en los Servicios de Proteómica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (Universidad Autónoma, Madrid).

#### 3.5.2. Identificación de los sitios de fosforilación

Los sitios de fosforilación de la ProT $\alpha$  y de la M2-PK se identificaron mediante análisis espectrométrico *Linear Ion Traps-MS* (LIT) de los péptidos trípticos derivados usando el modo de *Simple Ion Reaction* (SIR) [Villar *et al.*, 2006].

### 3.6. PURIFICACIÓN DE LA ISOFORMA M2-PK CON ACTIVIDAD PROT $\alpha$ K Y ACTIVIDAD PK EN CÉLULAS NC37

#### 3.6.1. Fraccionamiento secuencial con sulfato amónico y cromatografía de afinidad a ProT $\alpha$

Los extractos citosólicos de células NC37 fueron cromatografiados directamente en columnas de ProT $\alpha$ -Sepharosa (como describen Pérez-Estévez *et al.*, 1997), o fraccionados previamente mediante precipitación secuencial con sulfato amónico (SA) hasta una saturación del 45% o 75% respectivamente, obteniendo así las fracciones de 45% y 75% SA (F45 SA y F75 SA) [Imamura & Tanaka, 1982], que fueron dializadas en tampón A y seguidamente sometidas también a cromatografía de afinidad sobre ProT $\alpha$ -Sepharosa. Todas las operaciones cromatográficas se realizaron a 4°C.

A continuación, alícuotas de las diferentes fracciones cromatográficas obtenidas fueron dializadas frente a tampón A para realizar ensayos de actividad ProT $\alpha$ K o dializadas frente a tampón 10 mM fosfato potásico pH 6, con 2mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol y 0.2 mM FBP (tampón B) para posteriores ensayos de actividad PK.

### 3.6.2. Purificación de las actividades ProTαK y PK

Las fracciones con actividad ProTαK separadas mediante cromatografía de afinidad de la F45 SA fueron concentradas por centrifugación en concentradores Amicon (límite de exclusión de 10.000 Da) y más tarde purificadas mediante cromatografía de intercambio iónico-HPLC en las condiciones previamente descritas por Pérez-Estévez *et al.*, 1997. Así, estas fracciones fueron cromatografiadas en una columna Spherogel-TSK DEAE-SPW (7.5 x 75 mm) equilibrada previamente con tampón A, en un sistema HPLC *Beckman Gold*. La columna fue eluida con 0-0.8 M NaCl (gradiente lineal) en el mismo tampón. El flujo empleado fue de 0.5 ml/min y se recogieron fracciones cada minuto.

La PK en la F75 SA fue purificada mediante el método descrito por Imamura & Tanaka, 1982: cromatografía de fosfocelulosa (equilibrada con tampón B) y elución con tampón 70 mM fosfato potásico pH 6, con 0.2 mM FBP y 0.5 mM PEP, seguida de otra elución con tampón 70 mM fosfato potásico pH 6, 0.2 mM FBP y 0.6 M KCl.

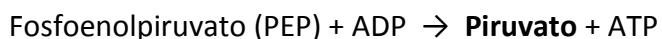
Las fracciones de la ProTαK y la PK purificadas fueron separadas mediante SDS-PAGE y ensayadas con anticuerpo anti-M2 (ver tabla de *Anticuerpos*, 1.3), y la proteína inmunoreactiva analizada mediante espectrometría de masas (apartado 3.5.1).

## 3.7. ENSAYOS DE ACTIVIDAD PK

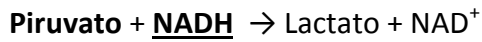
### 3.7.1. Determinación de la actividad PK mediante el método acoplado NADH-LDH

La actividad PK de los distintos extractos y fracciones fue determinada usando el método acoplado NADH-LDH [Bücher & Pfleiderer, 1955; revisado en Imamura & Tanaka, 1982]. Este método se basa en la medición espectrofotométrica de las variaciones de absorbancia (a 340 nm) de uno de los cosustratos de la reacción de la lactato deshidrogenasa (LDH) acoplada a la reacción catalizada por la piruvato quinasa presente en el medio: la coenzima reducida NADH.

La actividad PK viene determinada por la siguiente reacción catabólica:



A esta reacción, mediante la adición de la enzima lactato deshidrogenasa en la mezcla de incubación, se acopla la siguiente:



Las mezclas de reacción (1ml) contenían 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.1 M KCl, 5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 2 mM ADP, 2 mM PEP, 0.5 mM FBP, 0.18 mM  $\beta$ -NADH, y 8 U de  $\iota$ -LDH. La actividad PK fue calculada mediante monitorización de la reducción de absorbancia a 340 nm debida a la desaparición de NADH en la reacción acoplada.

### 3.7.2. Efecto de la FBP, $\text{Mn}^{+2}$ , L-cisteína, L-alanina y $\text{T}_3$ en la actividad PK

Los efectos de la FBP,  $\text{Mn}^{+2}$ , L-cisteína, L-alanina y  $\text{T}_3$  sobre la actividad PK fueron evaluados a las mismas concentraciones finales, tiempos y condiciones indicadas en el apartado 3.3.2.

## 3.8. VECTORES DE EXPRESIÓN DE LA PROT $\alpha$ Y TRANSFECCIÓN EN CÉLULAS 293T Y HELA

### 3.8.1. Vector de expresión: plásmido pcDNA 3.1(+) His<sub>6</sub>-c-myc (ver apartado 1.4).

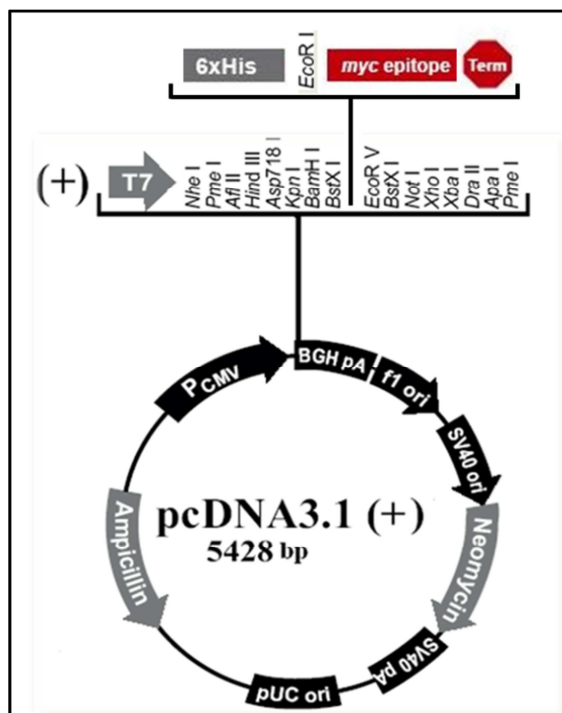


Figura 1. Principales elementos del vector plasmídico pcDNA 3.1(+) His<sub>6</sub>-c-myc y localización en su secuencia.

### 3.8.2. Inserto: cDNA de la ProTα

El inserto clonado en el vector de expresión pcDNA 3.1(+) His<sub>6</sub>-c-myc se corresponde con el cDNA de la ProTα humana [Eschenfeldt & Berger, 1986; Goodall *et al.*, 1986] y fue introducido en el lugar de restricción único de la enzima EcoR1 en el Sitio de Clonaje Múltiple (MCS) de dicho vector (*GenScript*) (figura 1).

Asimismo, se generó también un vector en el que se sustituyó mediante mutagénesis directa el codón ACC (Thr) en posición 7 de la secuencia de la ProTα (posición 14 del cDNA modificado) por GCA (Ala), obteniéndose de este modo 2 construcciones plasmídicas: 1) el vector recombinante que expresa la ProTα humana nativa [His<sub>6</sub>-c-myc ProTα (Thr)] y 2) el vector que expresa la ProTα mutada en posición 7 [(His<sub>6</sub>-c-myc ProTα (Ala)] (T7A).

- 1) tca gac gca gcc gta gac **acc** agc tcc gaa atc acc aag gac tta aag gag aag aag gaa gtt gtg gaa gag gca gaa aat gga aga gac gcc cct gct aac ggg aat gct aat ggggag cag gag gct gac aat gag gta gac gaa gaa gag gaa gaa ggt ggg gag gaa gag gag gag gaa gaa gaa ggt gat ggt gag gaa gag gat gga gat gaa gat gag gaa gct gag tca gct acg ggc aag cgg gca gct gaa gat gat gag gat gac gat gtc gat acc aag aag cag aag acc gac gag gat gac tag
- 2) **CAC CAC CAC CAC CAC CAC** tca gac gca gcc gta gac **acc** agc tcc gaa atc acc aag gac tta aag gag aag aag gaa gtt gtg gaa gag gca gaa aat gga aga gac gcc cct gct aac ggg aat gct aat ggggag cag gag gct gac aat gag gta gac gaa gaa gag gaa gaa ggt ggg gag gaa gag gag gag gaa gaa gaa ggt gat ggt gag gaa gag gat gga gat gaa gat gag gaa gct gag tca gct acg ggc aag cgg gca gct gaa gat gat gag gat gac gat gtc gat acc aag aag cag aag acc gac gag gat gac **GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAG GAT CTG ATT** tag
- 3) **CAC CAC CAC CAC CAC CAC** tca gac gca gcc gta gac **gca** agc tcc gaa atc acc aag gac tta aag gag aag aag gaa gtt gtg gaa gag gca gaa aat gga aga gac gcc cct gct aac ggg aat gct aat ggggag cag gag gct gac aat gag gta gac gaa gaa gag gaa gaa ggt ggg gag gaa gag gag gag gaa gaa gaa ggt gat ggt gag gaa gag gat gga gat gaa gat gag gaa gct gag tca gct acg ggc aag cgg gca gct gaa gat gat gag gat gac gat gtc gat acc aag aag cag aag acc gac gag gat gac **GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAG GAT CTG ATT** tag

**Figura 2. Secuencia de los diferentes insertos introducidos en el vector pcDNA 3.1(+) His<sub>6</sub>-c-myc.** La secuencia 1 se corresponde con el cDNA de la ProTα humana; la secuencia 2 se corresponde con el cDNA de la ProTα humana a la que se le ha añadido la secuencia codificadora de 6 histidinas en el extremo N-terminal y la secuencia codificadora del péptido c-myc (EQKLISEEDL) en el C-terminal (ambas en negrita, subrayadas y en mayúsculas); finalmente, la secuencia 3 se corresponde con el cDNA de la ProTα humana con las 6 histidinas y el péptido c-myc añadidos y mutada en la posición 7 (14 en la secuencia de la construcción plasmídica completa) señalada en rojo: acc (Thr) → gca (Ala) (T7A).

### 3.8.3. Crecimiento (amplificación) y extracción del plásmido pcDNA 3.1(+) His<sub>6</sub>-c-myc

Para la amplificación del vector se transformaron bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  con el plásmido pcDNA 3.1(+) His<sub>6</sub>-c-myc, portador del cDNA de la ProT $\alpha$  humana nativa o mutada, mediante el tratamiento con CaCl<sub>2</sub> en frío [Sambrook *et al.*, 1989].

Las bacterias DH5 $\alpha$  transformadas se crecieron en 3 ml de LB con ampicilina (100  $\mu$ g/ml). Los cultivos se mantuvieron en agitación (200 r.p.m.) toda la noche a 37°C y, a continuación, fueron diluidos y sembrados en placas de LB-agar-ampicilina. Se crecieron toda la noche a 37°C y cuando las colonias individuales eran visibles y diferenciables, se picaron con palillos y se inocularon en cultivos de LB con ampicilina: se mantuvieron en agitación (200 r.p.m.) a 37°C hasta que su densidad óptica (D.O) a 600 nm se situó entre 1-1.5 (todos los pasos anteriores se realizaron a la llama). A continuación, se procedió a la extracción del plásmido utilizando el sistema *HiPure Plasmid Midiprep* de *Invitrogen* a partir de cultivos de 100 ml de cultivo bacteriano (siguiendo las instrucciones del fabricante). Se determinó su concentración y pureza espectrofotométricamente, y se almacenaron las dos construcciones plasmídicas (vector de la ProT $\alpha$  recombinante mutada T7A y no mutada) y el vector *vacío* en alícuotas a -80°C.

La presencia de los plásmidos en los eluidos finales se confirmó mediante el corte con la enzima de restricción EcoR1 (incubación 2 horas a 37°C) seguido de electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TAE 1X con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml) a 65 voltios; y visualización UV (según el protocolo descrito en Sambrook *et al.*, 1989).

### 3.8.4. Transfección de células 293T y HeLa

**EN FRASCO (Falcon de 25 cm<sup>2</sup>):** Las células 293T o HeLa fueron transfectadas cuando la confluencia de la monocapa se encontraba en torno al 70-80%. Previamente a la transfección, las células se mantuvieron 2 horas en un volumen de 5 ml de DMEM sin FBS ni antibiótico, en atmósfera humidificada, a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

**EN POCILLO (placa *Falcon* de 24 pocillos; 2 cm<sup>2</sup>/pocillo):** Las células HeLa o 293T fueron tripsinizadas 24 horas antes de la transfección, cuando su confluencia en la monocapa se situaba en torno a un 70-80%. Se resuspendieron en 5 ml de DMEM 10% FBS 1% antibiótico y se tomó una alícuota para su conteo microscópico y la determinación de su viabilidad mediante el método del azul tripán. La concentración celular final se ajustó por dilución o por centrifugación y resuspensión en el volumen necesario de DMEM, según el caso, a  $3 \times 10^5$  células/ml. En los pocillos de la placa se colocaron cubres circulares ( $\varnothing$  13 mm) esterilizados mediante flameado en metanol y se añadió 0.5 ml de cultivo celular resuspendido ( $1.5 \times 10^5$  células). Las células se mantuvieron en atmósfera humidificada a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Dos horas antes de la transfección, y tras observar microscópicamente el crecimiento y confluencia celular de la monocapa y la correcta adherencia a los cubres, a las células les fue retirado el medio de cultivo y se les añadió 0.5 ml de DMEM sin FBS ni antibiótico/pocillo. Permanecieron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> hasta el momento de la transfección.

La transfección se llevó a cabo en ambos casos utilizando *LipofectAMINA 2000* y siguiendo las instrucciones del fabricante para la formación de complejos estables DNA-liposomas, que fueron añadidos directamente al medio de cultivo celular. La *Lipofectamina 2000* fue agitada vigorosamente antes de la realización de las mezclas de transfección.

MEZCLAS DE TRANSFECCIÓN	
<b>FRASCO</b> <b>(<math>5 \times 10^6</math> CÉLULAS)</b>	<p><b>6 µg plásmido + 0.5 ml DMEM</b></p> <p>5' ↓</p> <p><b>15 µl lipofectamina + 0.5 ml DMEM</b></p>
<b>POCILLO</b> <b>(<math>4 \times 10^5</math> CÉLULAS)</b>	<p><b>0.7 µg plásmido + 25 µl DMEM</b></p> <p>5' ↓</p> <p><b>1.5 µl lipofectamina + 25 µl DMEM</b></p>

Todas las mezclas se realizaron con DMEM sin FBS ni antibiótico. Las mezclas de transfección que portaban el plásmido diluido en DMEM se añadieron 5 minutos después de su preparación a las mezclas de *LipofectAMINA 2000* diluida.

En el caso de las transfecciones en frasco, las mezclas completas tuvieron un volumen aproximado de 1 ml y se añadieron gota a gota a los frascos tras 20-30 minutos de incubación a temperatura ambiente. Antes de la adición, a los frascos se les retiró el DMEM (5 ml) sin FBS ni antibiótico y se les añadió 1.5 ml de DMEM fresco sin FBS ni antibiótico. El volumen final de transfección en cada frasco fue de 2.5 ml.

El volumen final de las mezclas completas de transfección en pocillo fue aproximadamente de 50  $\mu$ l, y se añadieron gota a gota a los pocillos tras 20-30 minutos de incubación a temperatura ambiente. A los pocillos se les había retirado previamente el DMEM (0.5 ml) sin FBS ni antibiótico y se les había añadido 200  $\mu$ l de DMEM fresco sin FBS ni antibiótico. El volumen final de transfección en cada pocillo fue de 250  $\mu$ l.

Las células se mantuvieron de 4-6 horas en atmósfera humidificada a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Al cabo de ese tiempo, el medio fue retirado y sustituido por 5ml (frasco) o 0.5 ml (pocillo) de DMEM 10% FBS 1% antibiótico. Las células permanecieron 48 horas en atmósfera humidificada a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> hasta su extracción, lisis y análisis por *Immunowestern blot* o hasta su fijación y análisis por microscopía confocal de fluorescencia.

#### **3.8.5. Separación de la ProT $\alpha$ recombinante mediante cromatografía de Níquel-agarosa**

La purificación de la ProT $\alpha$  recombinante se llevó a cabo por cromatografía de Níquel-agarosa: *Nickel Chelate Kit (Hispanagar)*. Esta matriz de afinidad (compuesta de agarosa cargada con Ni) está diseñada específicamente para la unión y captura de proteínas recombinantes que poseen *colas* de histidina (10-20 mg proteína/ml matriz-gel).

Todas las fases del protocolo cromatográfico se realizaron a 4°C:

Se usó un volumen inicial de matriz Ni-agarosa de 75 µl y se centrifugó a 5100 x g durante 1 minuto para eliminar el etanol 30% en el que era conservada. Se lavó con 400 µl de agua destilada y seguidamente con 400 µl de tampón de equilibrado.

A continuación, la matriz fue bloqueada inespecíficamente con BSA 3% en PBS durante 10 minutos. Tras un lavado, se cargaron los extractos de las células 293T transfectadas ( $1-1.2 \times 10^7$  células). La unión de la ProTα recombinante de los extractos con la matriz se realizó durante 30 minutos. Seguidamente, la matriz fue lavada con tampón de equilibrado 0.5% Tritón X-100/ 5 mM imidazol. La elución de la ProTα recombinante se realizó con tampón de equilibrado 500 mM imidazol (2 veces con un volumen de tampón de 30 µl).

Finalmente, se determinó la concentración proteica de los eluidos por el método Bradford.

La detección de la ProTα recombinante en las muestras obtenidas se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.9.2 (SDS-PAGE y *Western blot*).

### 3.9. ENSAYOS INMUNOLÓGICOS

#### 3.9.1. Purificación de anticuerpos de conejo anti-ProTα por inmunoafinidad

La purificación de los anticuerpos anti-ProTα se realizó siguiendo el protocolo descrito por Harlow & Lane, 1988: los sueros anti-NT- y CT- ProTα (*NeoSystem*) fueron centrifugados a 3000 x g durante 30 minutos a 4°C y se les añadió un volumen de solución saturada (4 M) de sulfato amónico igual al inicial (en agitación y mantenidos a temperatura ambiente) durante 2 h. Después permanecieron durante 7 h a 4°C y fueron centrifugados a 3000 x g durante 30 minutos a 4°C. Los *pellets* se secaron al aire 10 minutos y se resuspendieron en PBS en 1/2 del volumen inicial de suero. Finalmente, fueron dializados en tripas de diálisis de 12 kDa de tamaño de poro frente a PBS pH 7.4 a 4°C durante 20 h.



A continuación, fueron incubados con una matriz de afinidad ProTα-Sepharosa en tampón 10 mM Tris pH 7.5 durante 24 h a 4°C en agitación. Se cargaron en columnas y se lavaron con tampón 10 mM Tris pH 7.5 y tampón 10 mM Tris pH 7.5, 0.5 M NaCl.

Se llevó a cabo una primera elución con tampón glicina 100 mM pH 2.5. Seguidamente, se realizó un lavado con tampón 10 mM Tris pH 8.8 y una segunda elución con 100 mM trietilamina pH 11.5.

Las fracciones recogidas se combinaron y concentraron en *Amicon* a 3000 x g durante 4°C en ciclos de 15 minutos. Cuando se alcanzó un volumen final en torno a 400-500 µl de eluido, se realizaron 5 ciclos de diálisis con 10 volúmenes de PBS.

La concentración final de anticuerpos purificados anti-NT- y CT- ProTα en los eluidos concentrados y dializados se calculó en base a su absorbancia a 280 nm. Se dividieron en alícuotas y se congelaron a -20°C.

### **3.9.2. Análisis por SDS-PAGE e inmunodetección por *Western blot* de la ProTα**

La electroforesis SDS-PAGE se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de Laemmli, 1970. La concentración de poliacrilamida empleada para el gel concentrador fue del 4% y para el gel separador del 15%. A las alícuotas (40 µg) de los diferentes extractos se les añadió 5 µl de tampón de muestra 5X y pironina al 1%, y se completaron con H<sub>2</sub>O destilada hasta un volumen final de 20 µl. Fueron calentadas a 100°C durante 5 minutos y microfugadas. Las muestras se corrieron a un amperaje constante de 35 mA hasta la salida del frente de pironina.

La transferencia proteica se realizó a membranas de nitrocelulosa activadas para la ProTα [Lauritzen *et al.*, 1990]. Brevemente, la activación se llevó a cabo mediante la incubación de la membrana en una solución de divinil sulfona (1.03 ml), dimetilformamida (2 ml) y 0.5M NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 10 (17 ml) durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación suave; seguidamente, fue incubada 30 minutos en 1% trietilamina y, finalmente, tratada con 1% glutaraldehído en 0.5M NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 10 durante 15 minutos. Tras el proceso, las membranas se lavaron en agua *miliQ* a temperatura ambiente durante 24 h.

Las proteínas se transfirieron durante 7 horas a 45 mA constantes y 13 V a 4°C, en tampón acetato sódico 20 mM pH 4.5 [Karetsou *et al.*, 1998].

La inmunodetección se realizó según los protocolos estándar, utilizando TBS-0.2% Tween pH 7.6 para los lavados de las membranas y leche en polvo disuelta al 5% en TBS-0.2% Tween para los bloqueos e incubaciones con los anticuerpos específicos. Se utilizaron 3 anticuerpos primarios diferentes para la detección de la ProTα: un anticuerpo anti-NT-ProTα capaz de reconocer a la ProTα endógena y a la ProTα recombinante expresada en las células, un anticuerpo anti-histidina que tiene como epitopo los 6 residuos de histidina del extremo N-terminal de la ProTα recombinante y un anticuerpo anti-c-myc que reconoce el péptido c-myc del extremo C-terminal. Los anticuerpos secundarios usados llevaban conjugada la enzima peroxidasa (HRP).

ANTICUERPO PRIMARIO		ANTICUERPO SECUNDARIO (1h 30')
Anti-NT-ProTα (NeoSystem) d: 1/800	2h r.t. + 2h/4°C → en agitación	Anti-conejo-HRP (ECL Western blotting analysis system, GE healthcare) d: 1/5000
Anti-Histidina (Quiagen) d: 1/800	2h r.t. + 2h/4 °C → en agitación	Anti-ratón-HRP (ECL Western blotting analysis system, GE healthcare) d: 1/5000
Anti- c-myc (Sigma) d: 1/2000	2h r.t. + 2h/4 °C → en agitación	Anti-conejo-HRP (ECL Western blotting analysis system, GE healthcare) d: 1/5000

El revelado de las membranas se realizó utilizando el kit ECL (*Western blotting analysis system, GE healthcare*) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 3.9.3. Análisis por SDS-PAGE e inmunodetección por *Western blot* de la ProTαK

Alícuotas de los diversos fraccionados celulares (40 µg) o inmunoprecipitados (20 µl) fueron separadas mediante SDS-PAGE según el protocolo de Laemmli, 1970. La concentración de poliacrilamida empleada para el gel separador fue del 8% y para el gel concentrador del 4%.

Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  durante 2 h a 50 V constantes y a 4°C en tampón 50 mM Tris pH 8.3, 380 mM glicina, 0.1% SDS y 20% metanol, donde fueron incubadas con los anticuerpos primarios: anti-M1 o anti-M2. Los sitios de unión inespecífica se bloquearon con 5% leche en polvo en TBS-0.1% Tween. La inmunodetección se realizó con los anticuerpos diluidos en la solución anterior, mediante incubaciones de 2 h a temperatura ambiente o 16 h a 4°C. Tras los lavados con TBS-0.1% Tween, la incubación con los anticuerpos secundarios-HRP fue de 60 minutos. Las proteínas inmunoreactivas se detectaron mediante peroxidasa empleando el sistema ECL (*Western blotting analisis system, GE healthcare*) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **3.9.4. Ensayos de inmunosupresión**

La inmunodepleción y los inmunoensayos de actividad ProT $\alpha$ K se realizaron usando la ProT $\alpha$ K purificada de la fracción F45 SA de extractos citosólicos de células NC37. Para los ensayos de inmunodepleción [Kishimoto *et al.*, 1991], alícuotas (50  $\mu\text{g}$ ) de la ProT $\alpha$ K fueron incubadas en tampón de ensayos quinasa (50  $\mu\text{l}$ ) con cantidades variables de suero no inmune, suero anti-M1 o anticuerpo anti-M2. Las mezclas se incubaron 4 horas a 4°C con agitación suave. Posteriormente, fueron añadidos 40  $\mu\text{l}$  de proteína A enlazada a Sepharosa (para el suero no inmune) o proteína G (para el suero anti-M1 y el anticuerpo anti-M2), y las mezclas se incubaron otras 2 horas a 4°C. Los inmunocomplejos se obtuvieron por centrifugación, y la actividad quinasa en el sobrenadante fue ensayada después de añadir 100  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP a las mezclas de reacción.

#### **3.9.5. Inmunoprecipitación de la ProT $\alpha$ K**

Para la inmunoprecipitación, la ProT $\alpha$ K purificada (300  $\mu\text{g}$ ) fue diluida en 500  $\mu\text{l}$  de tampón de inmunoprecipitación (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 75 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 0.2% CHAPS, 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF y 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de leupeptina, pepstatina y aprotinina), preincubada con 20  $\mu\text{l}$  de suero no inmune 2 horas a 4°C, e incubada con 20  $\mu\text{l}$  de suero anti-M1 o 3  $\mu\text{g}$  de anti-M2 (previamente acoplados a 40  $\mu\text{l}$  de proteína

G-Sepharosa) durante 4 horas a 4°C. Los inmunocomplejos fueron recuperados por centrifugación y lavados 3 veces con tampón de inmunoprecipitación.

Para los inmunoensayos quinasas [Mullapudi *et al.*, 2000], alícuotas del material inmunoprecipitado fueron lavadas 2 veces con tampón de ensayos quinasas, suspendidas en 35 µl del mismo tampón y la actividad quinasas ensayada.

### **3.9.6. Ensayos de coimmunoprecipitación ProTα-M2 en células NC37 y células 293T transfectadas**

#### **i) Ensayos de coimmunoprecipitación en células NC37**

Los ensayos de coimmunoprecipitación en extractos citosólicos de células NC37 (3 mg) se realizaron usando anticuerpos purificados anti-NT- y CT- ProTα (20 µg respectivamente) previamente acoplados a proteína G (20 mg) según el protocolo descrito por Harlow & Lane, 1988. Brevemente, el acoplamiento a proteína G se llevó a cabo en PBS durante 1 h a 4°C con agitación suave. A continuación, los complejos anticuerpo-proteína G fueron lavados con tampón 0.2 M borato sódico pH 9, y se añadió dimetilpimelimidato (DMP) a una concentración final de 5 mg/ml en el mismo tampón (en agitación y durante 30 minutos). Finalmente, la reacción de acoplamiento se detuvo mediante la incubación con tampón 0.1 M Tris-HCl pH 8, seguida de 2 lavados con tampón NET y resuspensión en PBS. Los complejos fueron obtenidos por centrifugación a 3000 x g durante 5 minutos.

La inmunoprecipitación se realizó durante 24 h a 4°C. Los extractos fueron centrifugados a 400 x g durante 1 minuto y los *pellets* resultantes se lavaron 2 veces con tampón NET (5 min a 4°C) y 1 vez con PBS (5 min a 4°C). Los inmunoprecipitados se eluyeron con 40 µl de tampón de muestra 1.5X, se calentaron a 100°C durante 5 min y se microfugaron.

Los inmunocomplejos obtenidos fueron separados por SDS-PAGE y analizados mediante *Western blot*.

## ii) Ensayos de coimmunoprecipitación en células 293T transfectadas

Lisados (1.5 mg) de células 293T transfectadas (apartado 3.8.3) con el vector que expresa la ProTα recombinante o con el vector *vacío* fueron tratados con 20 µl de suero preinmune ligado a proteína A (4h a 4°C) y, seguidamente, inmunoprecipitados durante 24 h a 4°C con anticuerpo anti-c-myc (8.5 µg) acoplado a proteína A (según el protocolo descrito en el apartado anterior). Los lisados fueron centrifugados a 400 x g durante 1 minuto y los *pellets* lavados 2 veces con tampón NET (5 min a 4°C) y 1 vez con PBS (5 min a 4°C). Los inmunoprecipitados se eluyeron con 30 µl de tampón de muestra 1.5X, se calentaron a 100°C durante 5 minutos y se microfugaron.

Los inmunocomplejos obtenidos fueron separados por SDS-PAGE y analizados mediante *Western blotting*.

### 3.9.7. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de la proteínas inmunoreactivas en los diferentes fraccionados fue determinada mediante análisis densitométrico (*software Quantity One de BIO-RAD*) de los respectivos *Western blots*, refiriendo la concentración de la proteína correspondiente en estos fraccionados respecto a la proteína total estimada en los *inputs*.

## 3.10. ANÁLISIS DE FOSFOAMINOÁCIDOS

### 3.10.1. Purificación de la proteína M2 fosforilada *in vivo*

El análisis de fosfoaminoácidos de la proteína M2 fosforilada *in vivo* se realizó según el protocolo descrito por Van der Geer *et al.*, 1993. La isoforma M2 de la PK fue purificada de extractos de células NC37 marcadas metabólicamente (400 x 10<sup>6</sup> c.p.m.) mediante precipitación con sulfato amónico (F45 SA), cromatografía de afinidad a ProTα-Sepharosa e inmunoprecipitación con anticuerpo monoclonal anti-M2. Los inmunocomplejos fueron sometidos a electroforesis SDS-PAGE, transferidos a membranas de PVDF y detectados por autorradiografía. La identidad de la proteína M2 se confirmó mediante *Western blot*.

### 3.10.2. Hidrólisis y análisis en capa fina

Las bandas que contenían proteína M2 radiactiva fueron cortadas, hervidas durante 2 horas en 200 µl de 6 N HCl a 110°C en viales cerrados con atmósfera de N<sub>2</sub> y centrifugadas. El sobrenadante fue diluido con agua y liofilizado. Los *pellets* secos fueron resuspendidos en 10 µl de tampón de electroforesis (50:5:945 ácido acético/pirimidina/agua, pH 3.5) conteniendo 0.5 mg/ml de fosfoserina, fosfotreonina y fosfotirosina y sometidos a electroforesis de una dimensión en capa fina en placas de celulosa (*Merck*) a 4°C durante 1 hora a 1000 V. A continuación, se secaron las placas, se tiñeron con ninhidrina 0.25% en acetona y se autorradiografiaron para detectar los aminoácidos marcados con [<sup>32</sup>P].

### 3.11. ENSAYOS DE DESFOSFORILACIÓN

La desfosforilación se realizó mediante incubación de los componentes de la F45 SA y la F75 SA en presencia de fosfatasa alcalina biotinilada (0.1 U/µg) en 50 mM Tris-HCl pH 7.9, 100 mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub> y 0.1 mM ZnCl<sub>2</sub> durante 30 minutos a 37°C.

La fosfatasa alcalina fue eliminada mediante incubación con estreptavidina-agarosa siguiendo las instrucciones del fabricante (*New England Biolabs*).

### 3.12. FILTRACIÓN EN GEL

Componentes de la F45 SA (600 µg) y de la F75 SA (400 µg) de extractos citosólicos de células NC37, tratados o no tratados con 5 mM FBP y/o fosfatasa alcalina, fueron cromatografiados en columnas Superdex 200 (GL/300) (*GE Life Sciences*) en 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, y 0.18% CHAPS a un flujo de 0.4 ml/min. Se recogieron fracciones cada minuto y la actividad ProTαK y PK fue ensayada en alícuotas (1/10) de cada fracción individualmente. La presencia de la proteína M2 inmunoreactiva se determinó mediante el análisis de alícuotas (1/20) de las distintas fracciones por *Western blot*.

### 3.13. ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA CONFOCAL

#### 3.13.1. Citolocalización de la ProTα endógena y/o la His<sub>6</sub>-c-myc ProTα (nativa y mutada en Thr7) en células 293T y HeLa transfectadas y sin transfectar

Transcurridas 48 horas después de la transfección en placa de 24 pocillos sobre cubreobjetos circulares esterilizados (apartado 3.8.3), las células 293T o HeLa fueron sometidas a ensayos de inmunofluorescencia siguiendo el protocolo descrito en Spector *et al.*, 1998. Para ello fueron lavadas con PBS (300 µl/pocillo) e inmediatamente fijadas con 4% paraformaldehído en PBS (300 µl/pocillo) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células 293T y HeLa sin transfectar fueron tratadas de forma similar cuando alcanzaron un 70-80% de confluencia.

Tras un lavado con PBS, se procedió a la permeabilización de las células fijadas con 0.2% Tritón X-100 en PBS (300 µl/pocillo) durante 2 minutos. A continuación, fueron lavadas 3 veces con PBS y bloqueadas con 3% BSA en PBS (300 µl/pocillo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 1 lavado con PBS se llevó a cabo la incubación con los anticuerpos específicos: las células se mantuvieron con el anticuerpo primario diluido con 3% BSA en PBS (300 µl/pocillo) durante 1 hora a temperatura ambiente, y con el anticuerpo secundario diluido con 3% BSA en PBS (300 µl/pocillo) durante 35 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Los núcleos celulares se tiñeron con colorante DAPI, diluido (0.2 µg/ml) en la mezcla de incubación de los anticuerpos secundarios. El protocolo finalizó con 2 lavados con PBS.

COMBINACIONES DE ANTICUERPOS			
ANTICUERPO PRIMARIO	Anti-c-myc (d: 1/1000)	Anti-c-myc (d: 1/1000) Anti-tubulina (d: 1/2000)	Anti-NT- o CT- ProTα purificado (d: 1/2000) Anti-tubulina (d: 1/2000)
ANTICUERPO SECUNDARIO	Anti-conejo (d: 1/5000) (Alexa 488)	Anti-conejo (d: 1/5000) (Alexa 488) Anti-ratón (d: 1/5000) (Alexa 594)	Anti-conejo (d: 1/5000) (Alexa 488) Anti-ratón (d: 1/5000) (Alexa 594)

Los anticuerpos secundarios de cabra anti-conejo (reconoce los anticuerpos anti-c-myc y anti-NT- o CT- ProTα purificado) y anti-ratón (reconoce el anticuerpo anti-tubulina) están marcados con 2 fluorocromos diferentes: Alexa 488 (emisión en verde) y Alexa 594 (emisión en rojo) respectivamente (*Invitrogen*).

Los cubreobjetos circulares con las células fijadas y teñidas se retiraron de los pocillos de la placa (eliminando los restos de PBS) y se colocaron en grupos de 3 sobre portaobjetos rectangulares. A cada cubre se le añadió 1 gota (7 µl) de Mowiol 4-88 (*Calbiochem*). Finalmente se colocó 1 cubreobjetos rectangular sobre los circulares montados en el portaobjetos y se inmovilizó en los extremos para iniciar el análisis por microscopía.

Para la observación microscópica de fluorescencia se utilizó un microscopio confocal espectral *Leica TCS-SP<sub>2</sub>* con software *Leica*, y la captura de imágenes se realizó con una cámara *Leica DFC 350 FX*.

### **3.14. ENSAYOS DE ACTIVIDAD APOPTÓTICA**

#### **3.14.1. Inducción apóptotica de cultivos de células 293T transfectadas y no transfectadas mediante incubación con estaurosporina**

24 horas después de la transfección de las células 293T empleando *LipofectAMINA* 2000 (apartado 3.9.3), al medio DMEM de los cultivos celulares se añadió estaurosporina (STS) a diferentes concentraciones finales: 0.2 µM, 0.5 µM y 1 µM. Estas concentraciones se combinaron con diferentes tiempos de incubación a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>: 1 h, 2 h, 4 h y 8 h, para determinar las condiciones óptimas de inducción apoptótica.



### 3.14.2. Preparación de lisados de células 293T apoptóticas

Tras la inducción apoptótica de los cultivos, las células 293T se tripsinizaron y se recogieron en 5 ml de PBS/frasco ( $10^6$  células/ml). Se centrifugaron 10 min a 4°C y se resuspendieron en 1 ml de tampón de lisis para la caspasa 9 (20 mM HEPES pH 6.5, 20 mM KCl, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% CHAPS, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 5 µg/µl leupeptina, 5 µg/µl pepstatina, 1 mM EDTA y 10 mM NaF) o de tampón de lisis para la caspasa 3 (20 mM HEPES pH 7.4, 20 mM KCl, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% CHAPS, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 5 µg/µl leupeptina, 5 µg/µl pepstatina, 1 mM EDTA y 10 mM NaF), siguiendo el protocolo descrito y revisado por Liu & Wang, 2000. Brevemente, las células se mantuvieron 30 min a 4°C y a continuación se lisaron mediante rotura en Potter (30 pasadas en hielo). Finalmente, los lisados fueron ultracentrifugados a 100.000 x g durante 1 h 30 minutos a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes y su concentración proteica fue determinada por el método Bradford.

### 3.14.3. Ensayos de actividad caspasa 9 y caspasa 3

A partir de cada lisado apoptótico obtenido mediante el procedimiento descrito en el apartado anterior se realizaron 2 mezclas de reacción (cada una por triplicado) conteniendo 20 y 40 µg de proteína respectivamente. Los sustratos fluorogénicos de la caspasa 9 (LEHD-AMC) y de la caspasa 3 (DEVD-AMC) (*BACHEM*) fueron añadidos a una concentración final de 25 µM. El volumen final de las mezclas fue de 100 µl y se alcanzó rellenando las muestras con tampón de ensayos de actividad caspasa 9 (20 mM HEPES pH 6.5, 20 mM KCl, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% CHAPS y 10 mM DTT) [adaptado de Zou *et al.*, 2003] o de actividad caspasa 3 (20 mM HEPES pH 7.4, 20 mM KCl, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% CHAPS y 10 mM DTT) [adaptado de Genini *et al.*, 2000]. Para las mezclas control se utilizaron alícuotas de los lisados de cultivos transfectados y no transfectados de células 293T sin tratar con estaurosporina.

Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante 1 o 2 horas y la actividad de las caspasas 9 y 3 fue determinada en un fluorímetro F-2000 (*HITACHI*) a partir de la intensidad de la fluorescencia generada (excitación a 360 nm-emisión a 460 nm) por el resto fluorocrómico liberado tras la rotura enzimática del respectivo sustrato sintético.

Paralelamente, alícuotas de los lisados fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE y analizadas por *Western blot*. La ProTα endógena y la ProTα recombinante fueron inmunodetectadas siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.9.2 y cuantificadas densitométricamente.

## **RESULTADOS**



## IV. RESULTADOS

<b>1. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA ACTIVIDAD PROT<math>\alpha</math>K EN LINFOCITOS NC37.....</b>	<b>105</b>
1.1. Purificación de la ProT $\alpha$ K en extractos citosólicos de células NC37.....	105
<b>2. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS ACTIVIDADES PROT<math>\alpha</math>K Y PK EN LINFOCITOS HUMANOS.....</b>	<b>108</b>
2.1. Estudio de la afinidad a ProT $\alpha$ de las actividades ProT $\alpha$ K y PK en extractos citosólicos de células NC37.....	108
2.2. Estudio de la afinidad a ProT $\alpha$ de las actividades ProT $\alpha$ K y PK en fraccionados por sulfato amónico de extractos citosólicos de células NC37.....	110
2.3. Análisis estructural de la isoforma M2 con actividad ProT $\alpha$ K y de la isoforma M2 con actividad PK.....	111
2.4. Caracterización inmunológica de la actividad ProT $\alpha$ K purificada de extractos citosólicos de células NC37.....	114
2.5. Estudio comparativo del patrón de afinidad a ProT $\alpha$ y de las actividades ProT $\alpha$ K y PK de la isoforma M1 de la PK.....	116
2.6. Estudio comparativo de la influencia de diferentes efectores sobre las actividades M2-ProT $\alpha$ K y M2-PK.....	117
<b>3. ESTUDIO DE LA BIFUNCIONALIDAD DE LA ISOFORMA M2 DE LA PK.....</b>	<b>120</b>
3.1. Efecto de la fosforilación de la proteína M2 en su funcionalidad dual .....	120
3.2. Influencia de la estructura cuaternaria de la proteína M2 en su bifuncionalidad.....	123

<b>4. INVESTIGACIÓN DEL COMPORTAMIENTO CELULAR DE LA PROT<math>\alpha</math> EN RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD PROT<math>\alpha</math>K Y LA PROTEÍNA M2.....</b>	<b>128</b>
4.1. Determinación de la interacción <i>in vivo</i> entre la proteína M2 y la ProT $\alpha$ en células en proliferación.....	128
4.2. Estudio de la actividad M2-ProT $\alpha$ K <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> e identificación de los lugares de fosforilación de la ProT $\alpha$ .....	132
<b>5. ESTUDIO PRELIMINAR DEL EFECTO BIOLÓGICO DE LA FOSFORILACIÓN DE LA PROT<math>\alpha</math>.....</b>	<b>135</b>
5.1. Estudio de la influencia de la fosforilación de la ProT $\alpha$ en su migración al núcleo de células en proliferación.....	135
5.2. Estudio de la influencia de la fosforilación de la ProT $\alpha$ en su actividad antiapoptótica.....	141

## IV. RESULTADOS

### 1. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA ACTIVIDAD PRO $\alpha$ K EN LINFOCITOS NC37

#### 1.1. Purificación de la Pro $\alpha$ K en extractos citosólicos de células NC37

Para purificar y caracterizar la proteína quinasa responsable de la fosforilación de la Pro $\alpha$  (Pro $\alpha$ K) en células en proliferación, se usaron extractos citosólicos de linfocitos B humanos transformados (células NC37) en los que previamente se habían encontrado elevados niveles de actividad Pro $\alpha$ K [Pérez-Estévez *et al.*, 1997]. Se diseñó un procedimiento de purificación con la finalidad de obtener grandes cantidades de Pro $\alpha$ K (esquemático en la figura 1) basado en la cromatografía de intercambio iónico en columnas de fosfocelulosa seguido por una cromatografía de afinidad a Pro $\alpha$  en columnas de Pro $\alpha$ -Sephara. Las fracciones de la Pro $\alpha$ K purificada cromatográficamente fueron, a continuación, separadas mediante SDS-PAGE y se buscó la actividad enzimática de la Pro $\alpha$ K entre sus componentes en el gel renaturalizado. Con ese objetivo, se empleó una modificación en la técnica de renaturalización de geles [Hutchcroft *et al.*, 1991] en la cual los ensayos de actividad Pro $\alpha$ K son realizados en condiciones renaturalizantes en los extractos de las porciones de 2 mm en las que los canales de los geles de poliacrilamida fueron cortados. Se había observado previamente que la actividad Pro $\alpha$ K copurificaba con una proteína de 60 KDa [Pérez-Estévez *et al.*, 2000], y este procedimiento permitía también ensayar la actividad Pro $\alpha$ K no solo en cada banda sino también combinando bandas localizadas en diferentes posiciones en los geles.

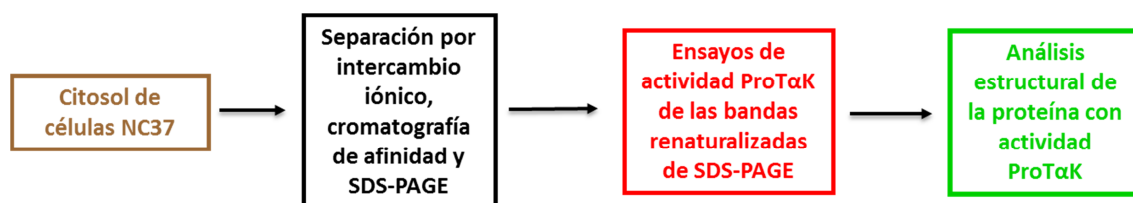


Figura 1. Esquema de la purificación de la quinasa que fosforila a la protimosina  $\alpha$  (Pro $\alpha$ K) en linfocitos (células NC37).

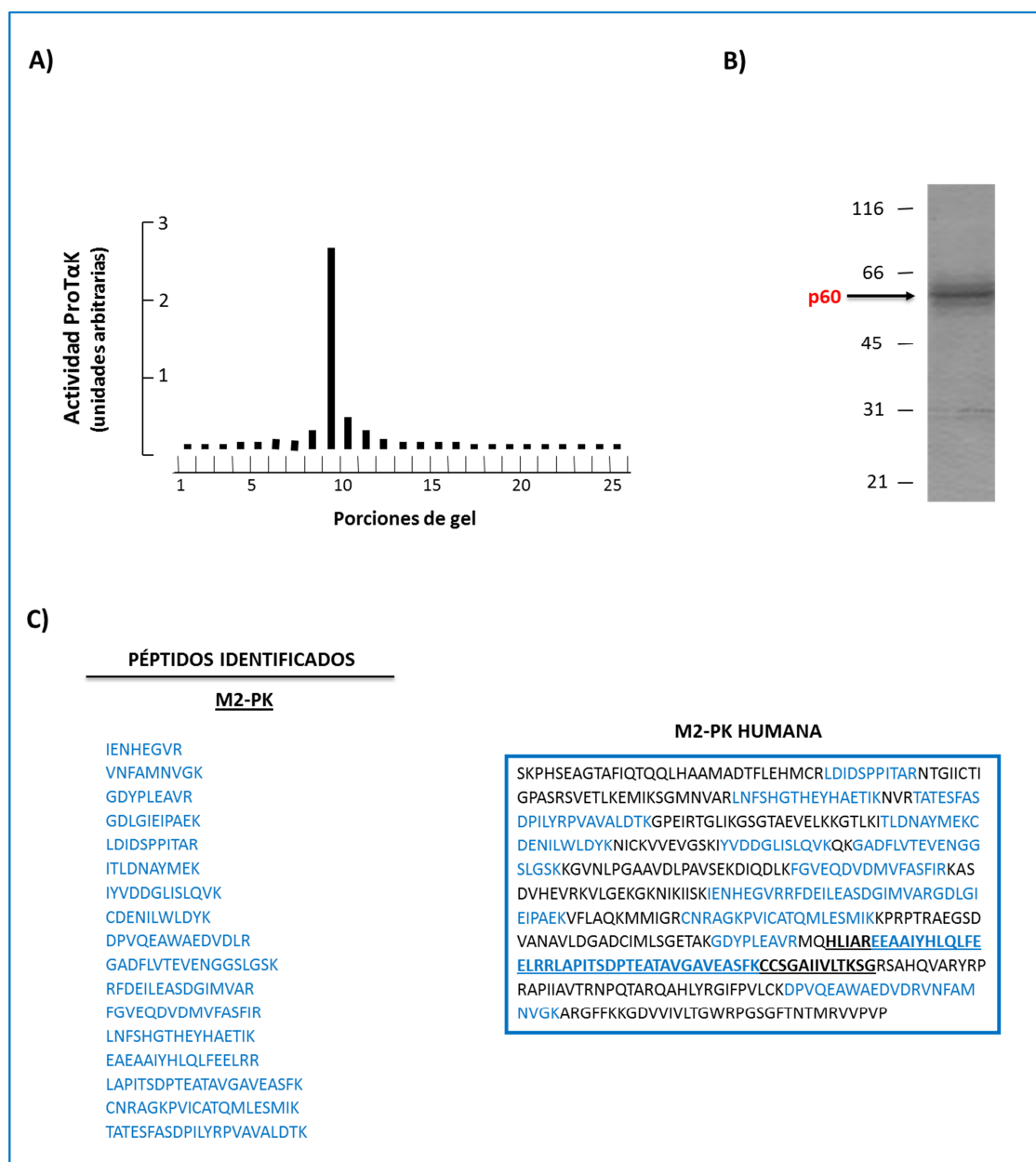
El análisis de las actividades ProTαK en los diferentes extractos de las porciones del gel de poliacrilamida (figura 2A) indicó que la actividad ProTαK se encontraba presente exclusivamente en las porciones que contenían proteínas en el rango de 60 kDa, y no se observaron variaciones en la actividad ProTαK cuando alícuotas de extractos de estas porciones se combinaron con otras (datos no mostrados).

La separación mediante SDS-PAGE de los componentes en la porción con la mayor actividad ProTαK demostró que contenía una única proteína (figura 2B). Esta proteína fue analizada por espectrometría de masas (se incluye el análisis en la figura 1 del *Anexo*) y en base a la secuencia de sus péptidos trípticos, mostrada en la figura 2C, se identificó como la isoenzima M2 de la piruvato quinasa humana (PK; EC 2.7.1.40) (secuencia en la figura 2C) [Tani *et al.*, 1988]. Esta identificación resultó inesperada y especialmente relevante, ya que indicaría un nuevo comportamiento catalítico para esta enzima. Es decir, la isoforma M2 de la PK, además de su actividad en la síntesis de ATP y piruvato en la glucólisis, presentaría una actividad de proteína quinasa empleando ATP.

La isoforma M2 es una de las cuatro isoenzimas (L, R, M1 Y M2) de la PK en mamíferos, las cuales son codificadas por dos genes distintos. Las isoenzimas L y R son codificadas por el gen PKL (con diferentes promotores específicos de tejido) [Noguchi *et al.*, 1987; revisado en Mazurek, 2011], mientras que los tipos M1 y M2 son los productos resultantes de un proceso de corte y empalme alternativo de un transcrito primario del gen PKM. La isoforma M2 difiere de la isoforma M1 en 23 de 531 aminoácidos, que se concentran en un segmento de 56 aminoácidos (a.a. 378-434) del extremo C-terminal de la proteína M2 (ver secuencia en la figura 2C), y que deriva de la inclusión alternativa del exón 9 (M1) o 10 (M2) [Noguchi *et al.*, 1986; Takenaka *et al.*, 1991; Clower *et al.*, 2010; David *et al.*, 2010].

Las características especiales de la isoforma M2, siendo expresada preferencialmente en células proliferantes y células tumorales [Reinacher & Eigenbrodt, 1981; Reinacher *et al.*, 1979; Yamada & Noguchi, 1999a; Staal & Rijksen, 1991] hacen factible su correspondencia con la ProTαK, ya que esta proteína quinasa es esencial para la proliferación celular, y además esas son las condiciones en las que tiene lugar la fosforilación de la ProTα [revisado en Freire *et al.*, 2002].





**Figura 2. Caracterización estructural de la proteína con actividad ProTαK purificada de extractos de células NC37. A) SDS-PAGE y ensayos de actividad ProTαK en gel.** La ProTαK, purificada por cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad, fue separada mediante SDS-PAGE y la actividad ProTαK ensayada en los extractos de las porciones de 2 mm del gel en condiciones renaturalizantes (se representa en cada porción por las barras oscuras). **B) Análisis SDS-PAGE de los componentes en la porción del gel con la actividad máxima de ProTαK.** La banda principal fue obtenida, digerida con tripsina, y los péptidos tripticos analizados por espectrometría de masas (figura 1 en Anexo). **C) Análisis mediante espectrometría de masas LS-ESI-IT de la proteína con actividad ProTαK.** Se indican las secuencias de los péptidos tripticos identificados en la espectrometría de masas y, en el recuadro, se presenta la secuencia de la isoenzima M2 de la PK humana [Tani *et al.*, 1988] (en la que se incluyen dichos péptidos). Los 56 aminoácidos del exón 10, que diferencia la isoenzima M2 de la isoenzima M1 [Noguchi *et al.*, 1986], aparecen en negrita y subrayados.

## 2. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS ACTIVIDADES PROT $\alpha$ K Y PK EN LINFOCITOS HUMANOS

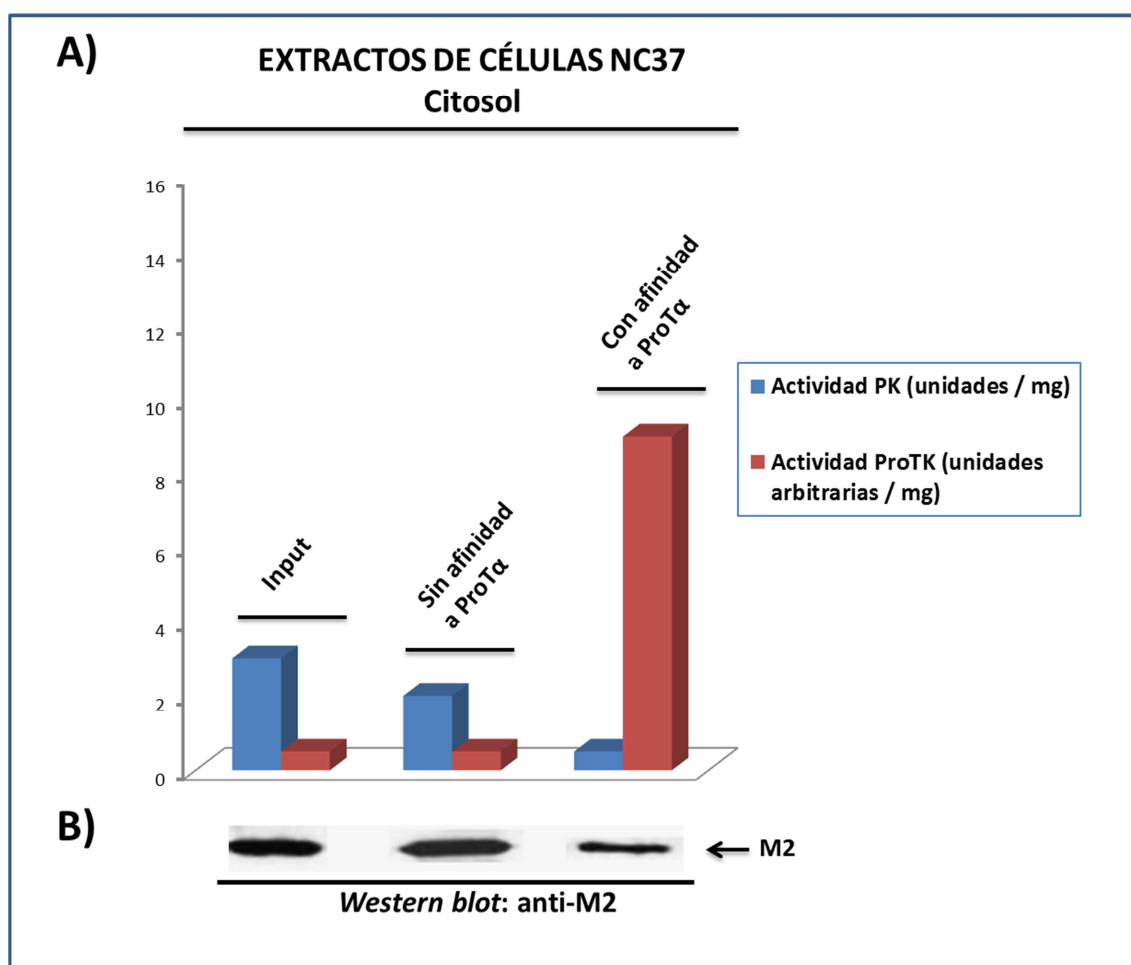
Los resultados obtenidos nos llevaron a diseñar, a continuación, una serie de experimentos conducentes a investigar las características de la evolución de la proteína M2 por las cuales se puede originar su habilidad para fosforilar a la PROT $\alpha$  (añadida a la capacidad catalítica de promoción de la síntesis de ATP en su actividad piruvato quinasa). Con este propósito llevamos a cabo un estudio comparativo de las actividades PROT $\alpha$ K y PK en extractos de células NC37.

### 2.1. Estudio de la afinidad a PROT $\alpha$ de las actividades PROT $\alpha$ K y PK en extractos citosólicos de células NC37

Inicialmente, y debido a los resultados de experimentos previos en nuestro laboratorio que demostraban la afinidad de la PROT $\alpha$ K por la PROT $\alpha$  ligada a Sepharosa [Pérez-Estévez *et al.*, 1997], se comparó la afinidad por la PROT $\alpha$  de las actividades PROT $\alpha$ K y PK en extractos citosólicos crudos.

Los resultados mostrados en la figura 3A indican que la actividad PROT $\alpha$ K se recupera exclusivamente en las fracciones con afinidad por la PROT $\alpha$ . Por el contrario, la actividad PK es retenida en su totalidad en la fracción sin afinidad por la PROT $\alpha$ .

Paralelamente, se analizó la presencia de la proteína M2-inmunoreactiva en los diferentes fraccionados de la cromatografía de afinidad empleando un anticuerpo monoclonal anti-M2 que reconoce exclusivamente esta isoforma y también un anticuerpo policlonal anti-M1 que es inmunoreactivo contra las isoformas M1 y M2. La proteína M2 fue detectada de manera similar en los distintos fraccionados separados mediante SDS-PAGE, y analizada por *Inmunowestern blot* utilizando ambos tipos de anticuerpos. En la figura 3B se muestra la inmunodetección con anti-M2.



**Figura 3. Análisis comparativo de la afinidad a ProTα-Sepharosa de las actividades PK y ProTαK en extractos de células NC37. A):** Componentes del citosol crudo (1 mg) fueron separados en columnas de ProTα-Sepharosa y las actividades ProTαK y PK determinadas en alícuotas de las fracciones con y sin afinidad a la ProTα: la actividad ProTαK fue ensayada en mezclas de reacción (25  $\mu$ l) en tampón de actividad quinasa conteniendo 5  $\mu$ g de ProTα como sustrato, incubadas durante 30 minutos a 37°C [Pérez-Estévez *et al.*, 1997]; la actividad PK fue ensayada en mezclas de 1ml en tampón de actividad PK que contenían 8 U de enzima L-lactato deshidrogenasa, monitorizando la reducción de su absorbancia a 340 nm [revisado en Imamura & Tanaka., 1982](*Material y Métodos*) **B):** Alícuotas (5  $\mu$ g) de estas fracciones fueron separadas mediante SDS-PAGE y analizadas por *Western blot* usando anticuerpos anti-M2 (ver Tabla de Anticuerpos en *Material y Métodos*). El *input* corresponde a un análisis similar de 10  $\mu$ g de citosol crudo. Los datos son representativos de tres experimentos independientes que difieren menos de un 15%.

La cuantificación de la proteína M2-inmunoreactiva en los *Western blots* de la figura 3B, indica que la mayoría de esta proteína (sobre un 90%) no presenta afinidad por la ProTα y se corresponde con la actividad PK, mientras que solo un 10% de la proteína

M2 es retenida por la ProT $\alpha$ -Sepharaosa junto con la actividad ProT $\alpha$ K (porcentajes similares fueron obtenidos a partir de los *Western blots* de la proteína M2-inmunoreactiva cuando se emplearon anticuerpos anti-M1).

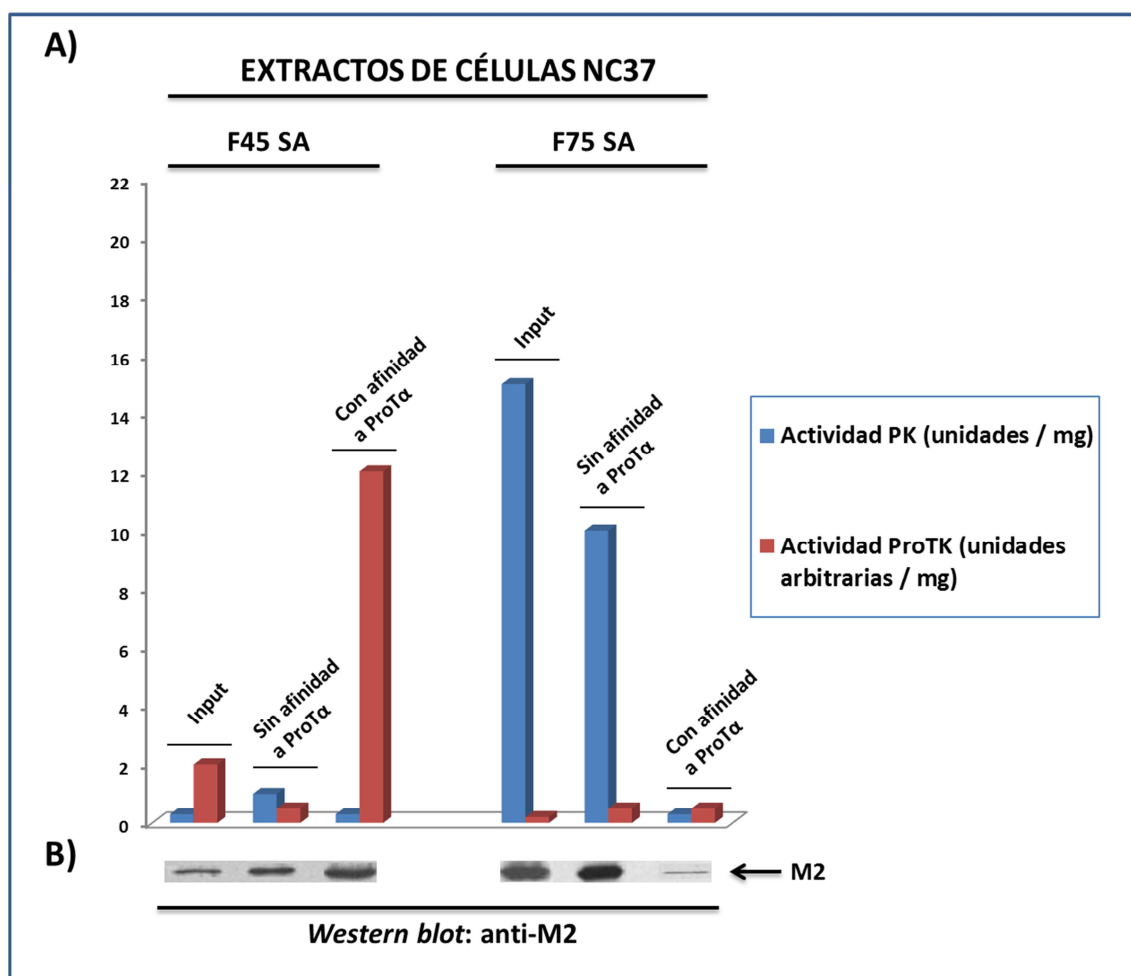
## **2.2. Estudio de la afinidad a ProT $\alpha$ de las actividades ProT $\alpha$ K y PK en fraccionados por sulfato amónico de extractos citosólicos de células NC37**

A continuación, se realizó un análisis similar en las fracciones citosólicas de células NC37 obtenidas mediante fraccionamiento con sulfato amónico (SA), que se ha demostrado eficaz en la separación de la actividad de la M2-PK en diversos extractos [Imamura & Tanaka, 1982]. Por ello, extractos citosólicos de células NC37 fueron secuencialmente fraccionados con el 45% (F45 SA) y luego con el 75% (F75 SA) de saturación de sulfato amónico.

Este fraccionamiento fue especialmente eficiente en la separación de las actividades ProT $\alpha$ K y PK, tal como se muestra en el análisis de las respectivas actividades enzimáticas en los diferentes fraccionados separados por afinidad a ProT $\alpha$ -Sepharaosa, presentado en la figura 4A: la actividad ProT $\alpha$ K aparece exclusivamente en la F45 SA y la actividad PK en la F75 SA.

Por otra parte, como se observa en los resultados de la figura 4A, las afinidades por la ProT $\alpha$ -Sepharaosa de las actividades ProT $\alpha$ K y PK muestran un patrón similar al encontrado en la separación de los componentes en extractos crudos de células NC37 (figura 3A), mostrando la actividad ProT $\alpha$ K una clara afinidad por la ProT $\alpha$ -Sepharaosa, mientras que la actividad PK no interactúa con ella.

El análisis por *Inmunowestern blot* de la distribución de la proteína M2 en los diversos fraccionados, utilizando anticuerpo anti-M2, se presenta en la figura 4B. La cuantificación densitométrica de la proteína M2 indicó que aproximadamente un 20% de esta proteína aparece en la F45 SA y un 80% en la F75 SA. En los extractos F45 SA, más de la mitad de la proteína M2 muestra afinidad por la ProT $\alpha$  acompañando a la actividad ProT $\alpha$ K, lo que representa sobre un 10% de la isoforma M2 total en las células NC37. En contraste, la proteína M2 recuperada en los extractos F75 SA junto con la totalidad de la actividad PK, no posee afinidad por la ProT $\alpha$ -Sepharaosa.



**Figura 4. Análisis comparativo de las actividades PK y ProTK en extractos de células NC37 fraccionados con sulfato amónico. A):** Componentes (1 mg) de las fracciones F45 SA y F75 SA fueron cromatografiados en columnas de ProTK-Sepharosa y las actividades ProTK y PK fueron ensayadas en las diferentes fracciones como se indica en la figura 3. **B):** Alícuotas (5 µg) de estas fracciones fueron separadas mediante SDS-PAGE y analizadas por *Western blot* usando anticuerpos anti-M2. El *input* corresponde a un análisis similar de 7 µg de componentes en la F45 SA y en la F75 SA. Los datos son representativos de tres experimentos independientes que difieren menos de un 15%.

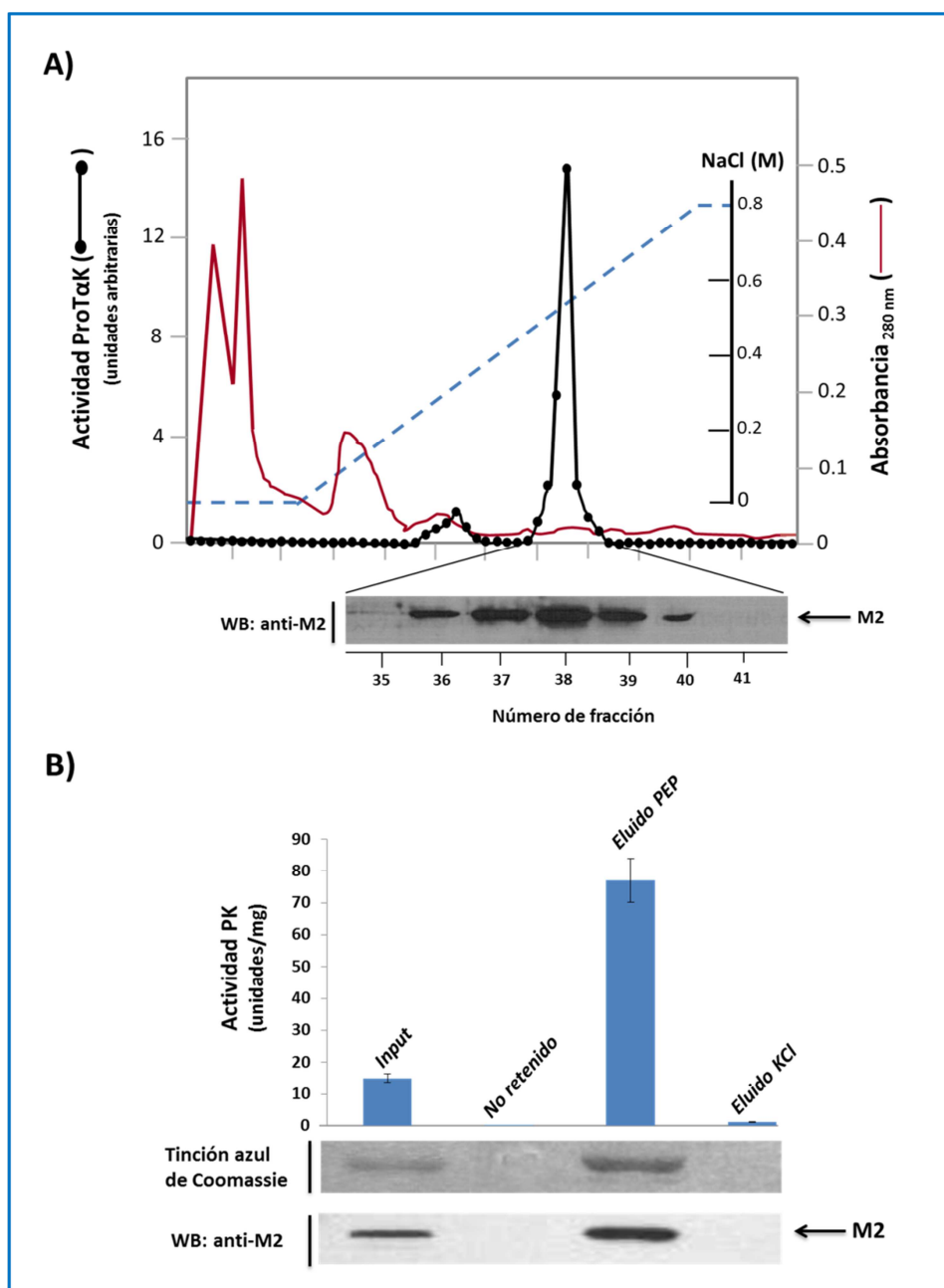
### 2.3. Análisis estructural de la isoforma M2 con actividad ProTK y de la isoforma M2 con actividad PK

Dado que la proteína M2 copurificaba con las dos actividades enzimáticas ProTK y PK, se decidió realizar un análisis estructural de la isoforma M2 presente en los fraccionados con estas actividades. Para ello, las actividades ProTK y PK fueron purificadas a partir de sus respectivos fraccionados citoplasmáticos precipitados con

sulfato amónico. Los componentes en la F45 SA fueron separados mediante HPLC de intercambio iónico siguiendo el protocolo establecido en nuestro laboratorio para la purificación de la ProTαK [Pérez-Estévez *et al.*, 1997], y los componentes de la F75 SA por cromatografía de intercambio iónico sobre fosfocelulosa y posterior elución con fosfoenolpiruvato (PEP), siguiendo el método descrito para la purificación de la M2-PK [Imamura & Tanaka, 1982].

En la figura 5A se presenta el diagrama de elución de la actividad ProTαK purificada de la F45 SA mediante HPLC de intercambio iónico, en el que se indican los niveles de la actividad ProTαK ensayada en las diferentes fracciones, así como el resultado del análisis por *Immunowestern blot* de las fracciones con dicha actividad empleando anticuerpo anti-M2. Como se muestra en dicha figura, la ProTαK coeluye con la proteína M2, con un patrón de elución similar al descrito para la ProTαK obtenida de extractos de esplenocitos de ratón [Pérez-Estévez *et al.*, 1997].

Asimismo, en la figura 5B se muestra el patrón de elución de la actividad PK contenida en la F75 SA y separada mediante cromatografía sobre fosfocelulosa. Como se indica en la figura, la actividad PK es eluida específicamente con PEP como una proteína pura que resulta inmunoreactiva con M2.



**Figura 5. Purificación de la isoforma M2 con actividad ProTαK y actividad PK en células NC37.**

**A) Purificación de la actividad ProTαK en la F45 SA de extractos de células NC37.** Las fracciones con actividad ProTαK separadas por cromatografía de afinidad sobre ProTα-Sepharosa fueron purificadas mediante HPLC de intercambio iónico, y ensayada la actividad ProTαK y la presencia de proteína M2 mediante *Inmunowestern blot* en las diferentes fracciones, tal como se indica en *Material y Métodos*.

**B) Purificación de la actividad PK en la F75 SA de extractos de células NC37.** El fraccionado F75 SA fue cargado sobre una columna de fosfocelulosa eluida secuencialmente con tampón de elución conteniendo 0.5 mM PEP y 0.6 mM KCl, ensayando en las diferentes fracciones la actividad PK y separando alícuotas de estas fracciones mediante SDS-PAGE para proceder a su tinción con azul de Coomassie o a su análisis por *Inmunowestern blot* con anti-M2 (*Material y Métodos* 1.3). Las líneas de error indican la  $\pm$ SD de 3 experimentos independientes.

La proteína inmunoreactiva con anti-M2 obtenida en ambas separaciones cromatográficas fue analizada mediante espectrometría de masas. El análisis espectrométrico de esta proteína con actividad ProTαK (figura 2 del *Anexo*) y actividad PK (figura 3 del *Anexo*) confirmó que la proteína que copurifica con ambas actividades (ProTαK y PK) se corresponde con la isoforma M2 de la PK.

De acuerdo con estos resultados, las actividades ProTαK y PK parecen corresponderse con dos formas de la proteína M2 separables mediante fraccionamiento con sulfato amónico, y diferenciadas por su afinidad a ProTα-Sepharosa.

#### **2.4. Caracterización inmunológica de la actividad ProTαK purificada de extractos citosólicos de células NC37**

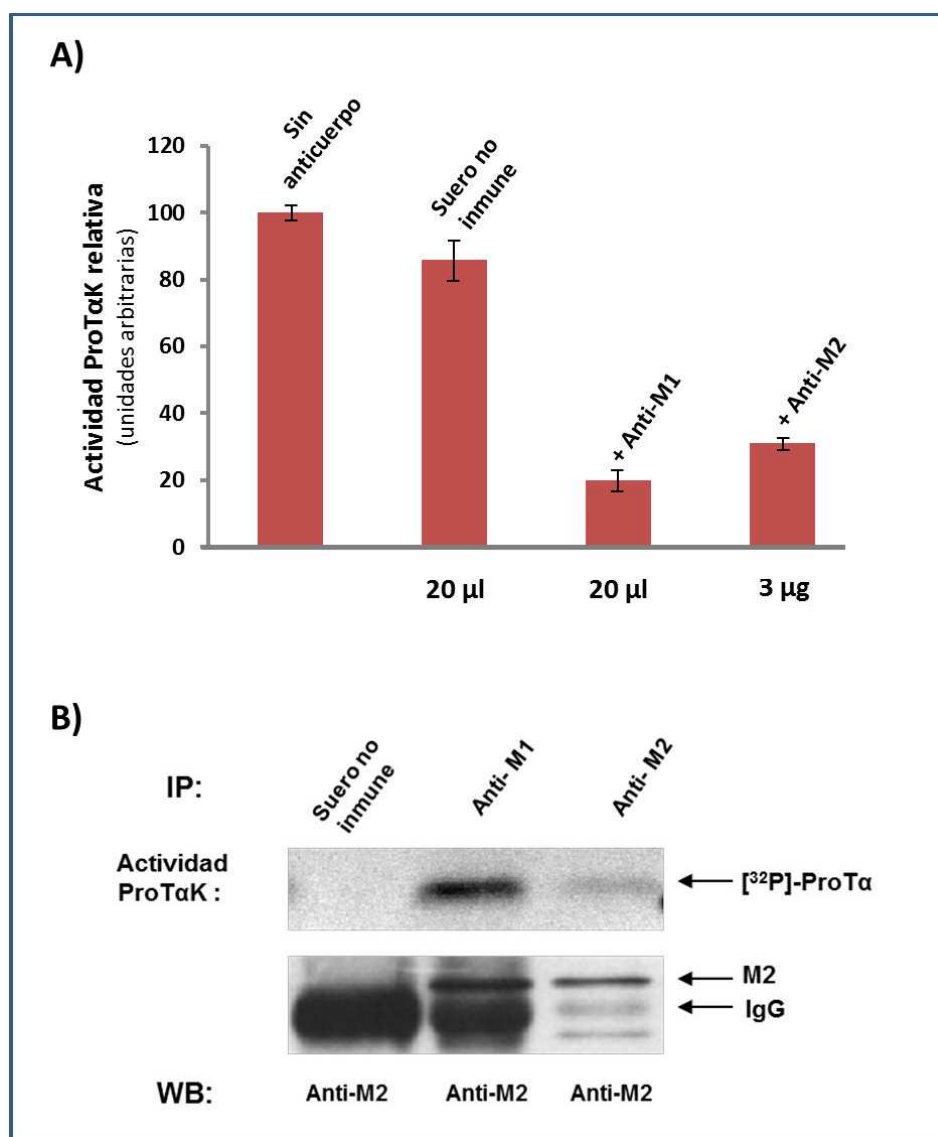
Para confirmar la relación de la ProTαK con la isoforma M2, llevamos a cabo experimentos de inmunosupresión y de inmunoprecipitación de la actividad de la ProTαK procedente de la purificación mediante HPLC de intercambio iónico de la F45 SA de células NC37, empleando los dos anticuerpos inmunoreactivos con M2 indicados anteriormente (apartado 2.1): anticuerpo monoclonal anti-M2 y suero anti-M1.

Como se indica en la figura 6A, los dos anticuerpos anti-M1 y anti-M2 suprimen de forma eficaz la actividad ProTαK de la enzima purificada.

Además, estos anticuerpos son capaces de inmunoprecipitar la proteína M2 de las fracciones de la ProTαK purificada (figura 6B). La isoforma M2 inmunoprecipitada fue utilizada para la realización *in vitro* de ensayos de actividad ProTαK, y los resultados de estos experimentos demostraron que dicha proteína provoca la incorporación de [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ortofosfato en la estructura de la ProTα, tal como señala la figura 6B.

En conclusión, estos análisis confirman que la proteína M2 que copurifica con la actividad ProTαK es la responsable de la actividad de fosforilación sobre la ProTα en células NC37.

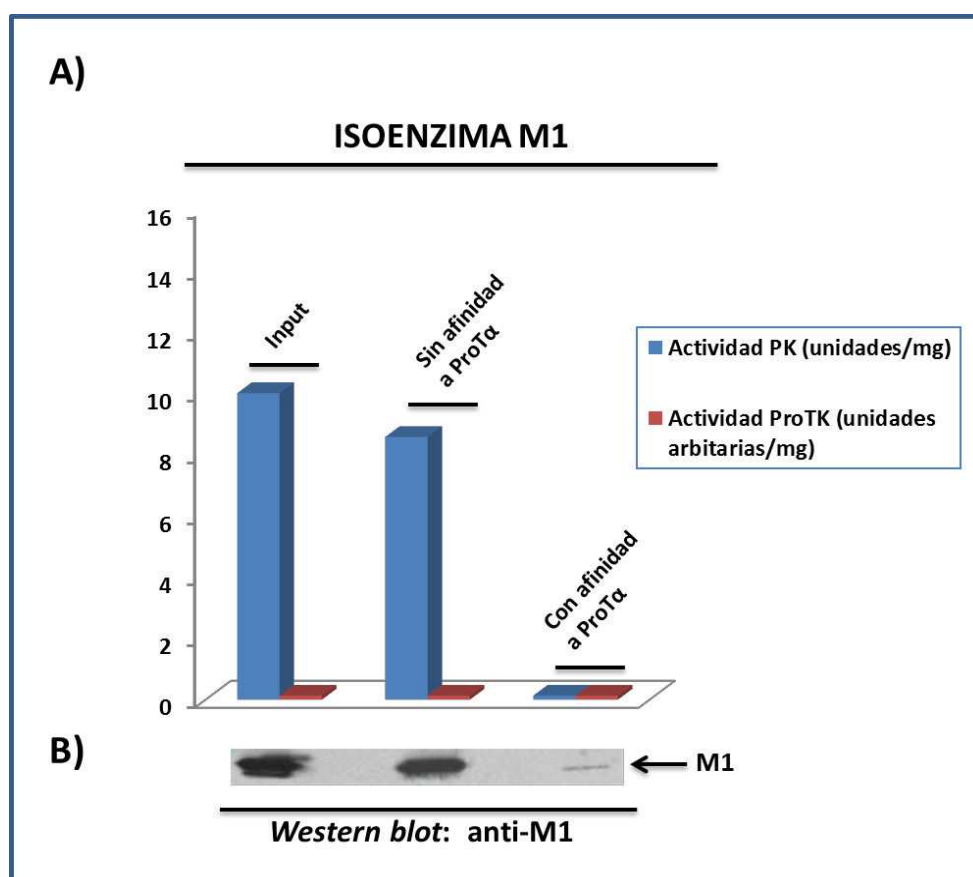




**Figura 6. Caracterización inmunológica de la ProTαK. A) Inmunosupresión de la actividad ProTαK con anticuerpos anti-M1 y anti-M2.** La actividad ProTαK, purificada mediante cromatografía de afinidad a ProTα y HPLC de intercambio iónico de la F45 SA de extractos citosólicos de células NC37, fue ensayada en ausencia o presencia de la cantidad señalada de suero no inmune, suero anti-M1 o anticuerpo monoclonal anti-M2. Las barras representan la actividad quinasa expresada como porcentaje de la actividad ProTαK en ausencia de anticuerpo. Las líneas de error indican la  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. **B) Inmunoprecipitación de la ProTαK mediante anticuerpos anti-PK.** La ProTαK purificada como en el panel A fue inmunoprecipitada con 20 µl de suero no inmune, 20 µl de suero anti-M1 o 3 µg de anti-M2. La actividad ProTαK, así como la presencia de la proteína M2, fue determinada en cada inmunocomplejo. La actividad ProTαK (panel superior) se corresponde a la  $[^{32}\text{P}]$ -ProTα detectada por autorradiografía en las respectivas mezclas de actividad quinasa separadas en SDS-PAGE. Alícuotas de los complejos inmunoprecipitados fueron también separadas paralelamente mediante SDS-PAGE y analizadas por *Western blot* usando anticuerpos anti-M2. La posición de la proteína M2 inmunoreactiva es indicada sobre la banda de inmunoglobulina (IgG) (panel inferior).

## 2.5. Estudio comparativo del patrón de afinidad a ProTα y de las actividades ProTαK y PK de la isoforma M1 de la PK

Con la finalidad de completar el estudio de la relación de las isoformas M de la piruvato quinasa con las actividades PK y ProTαK, investigamos la capacidad de la isoenzima M1 para interactuar y fosforilar a la ProTα, usando extractos de músculo de conejo que contienen de forma casi exclusiva dicha isoenzima [Reinacher *et al.*, 1979; Yamada & Noguchi, 1999a; revisado en Mazurek, 2011]. Con este fin, la M1-PK de músculo fue separada por su afinidad a ProTα-Sepharosa y en las fracciones obtenidas se ensayó su actividad ProTαK y PK.



**Figura 7. Análisis de las actividades PK y ProTαK en extractos musculares de conejo. A):** Extractos citosólicos de músculo de conejo fueron cromatografiados en columnas de ProTα-Sepharosa y sus actividades ProTαK y PK ensayadas en alícuotas de las fracciones con y sin afinidad a la ProTα como se indica en la figura 3. **B):** Alícuotas (5 µg) de estas fracciones fueron analizadas por *Immunowestern blot* usando suero anti-M1. El *input* corresponde al análisis de 5 µg de extracto citosólico crudo de músculo de conejo. Los datos son representativos de tres experimentos independientes que difieren menos de un 15%.

Los resultados en la figura 7 indican que la isoforma M1 se comporta de forma similar a la proteína M2 en la fracción F75 SA. Así, posee actividad PK, no tiene actividad ProTαK y presenta un bajo grado de afinidad a la ProTα-Sepharosa (figura 7A). Por otra parte, el análisis por *Immunowestern blot* de los diversos fraccionados (figura 7B) confirma que la proteína M1 presenta un comportamiento idéntico a la actividad PK.

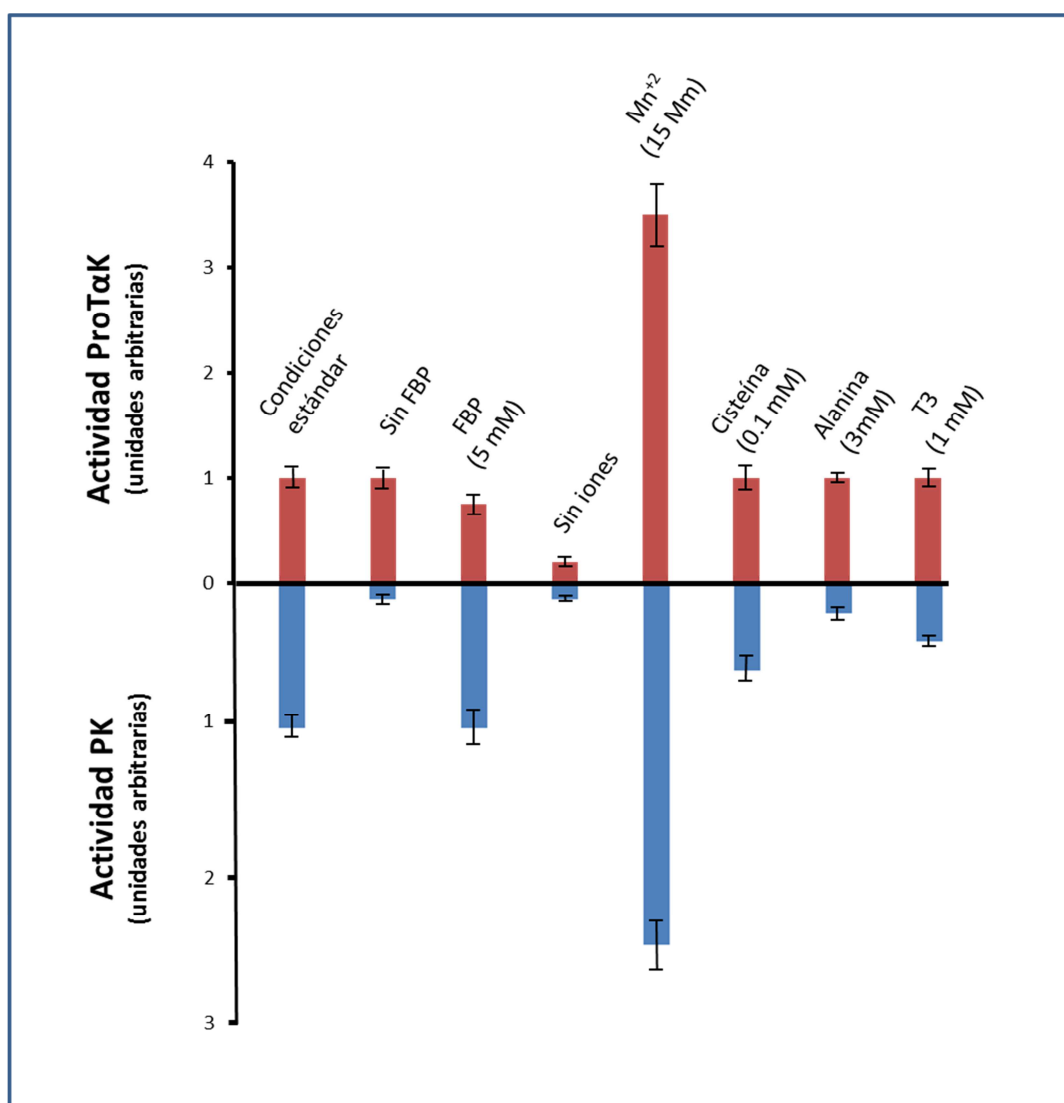
## **2.6. Estudio comparativo de la influencia de diferentes efectores sobre las actividades M2-ProTαK y M2-PK**

Para concluir el estudio comparativo de las actividades ProTαK y PK, se investigó la influencia que diversos efectores propios de la actividad PK tienen sobre la actividad ProTαK. Así, se analizó el efecto de la fructosa 1,6-bisfosfato (FBP), de los cationes  $Mg^{+2}$  y  $Mn^{+2}$ , y de los aminoácidos cisteína y alanina [revisado en Imamura & Tanaka, 1982 y Muñoz & Ponce, 2003; Ignacak & Stachurska, 2003] sobre las actividades ProTαK y PK purificadas de las fracciones F45 SA y F75 SA.

Los resultados en la figura 8 muestran que existen diferencias en la respuesta de las dos actividades enzimáticas frente a algunos efectores. Mientras que la FBP es esencial para la actividad PK (las condiciones estándar utilizadas para evaluar la actividad PK incluyen FBP), la actividad ProTαK no se ve afectada por esta molécula. Ambas actividades son dependientes de  $Mg^{+2}$  y  $Mn^{+2}$ , y este último tiene un fuerte efecto activador en un amplio rango de concentraciones, tal como ha sido descrito por Pérez-Estévez *et al.*, 2000. Los aminoácidos cisteína y alanina tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad PK, pero no afectan a la actividad ProTαK. Las actividades de la ProTαK y de la PK mostradas en la figura 8 se corresponden con los efectos máximos de cada efector a las concentraciones indicadas.

Se ha encontrado que en las células de mamíferos el monómero de la isoforma M2 funciona como una proteína de unión a la hormona tiroidea 3, 3', 5-triiodo-L-tironina ( $T_3$ ) en un proceso regulado por la FBP [Kato *et al.*, 1989]. La unión de esta forma monomérica de la M2 a  $T_3$  inhibe la actividad PK. Esta inhibición es revertida por la FBP, que permite una asociación tetramérica con elevada actividad PK de la proteína M2 [Kato *et al.*, 1989; Ashizawa *et al.*, 1991; Ashizawa & Cheng, 1992]. Por ello, se

investigó si esta hormona peptídica podría afectar a la M2-ProTαK. Específicamente, ensayamos la actividad M2-ProTαK a concentraciones de T<sub>3</sub> en las que esta molécula había demostrado inhibir la actividad M2-PK mediante un mecanismo dependiente de la FBP [Kato *et al.*, 1989]. Los resultados de estos experimentos (también mostrados en la figura 8) indican que mientras la T<sub>3</sub> inhibe la actividad PK, no afecta a la actividad M2-ProTαK, lo que sugiere una afinidad exclusiva de la T<sub>3</sub> por la proteína M2 con actividad PK.



**Figura 8. Estudio comparativo de la influencia de distintos efectores en las actividades M2-ProTαK y M2-PK.** Las actividades enzimáticas fueron ensayadas con la ProTαK y la PK, purificadas respectivamente como se indica en el apartado 3.6 de *Material y Métodos*, en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de los efectores. Las barras representan los niveles de actividad enzimática en condiciones estándar (sin efector) y los correspondientes en presencia de cada efector a las concentraciones indicadas. Las líneas de error indican la  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes.

También se ensayó el efecto del PEP sobre la actividad ProTαK, y se encontró que este metabolito no influye en dicha actividad (datos no mostrados). Además, el PEP es incapaz de reemplazar al ATP para la transferencia de ortofosfato a la ProTα; esto fue demostrado por la ausencia de generación de piruvato (como se describe en *Materiales y Métodos* apartado 3.3.3) en una mezcla de reacción que contenía M2-ProTαK, ProTα y PEP en sustitución de ATP.

A juzgar por los resultados del estudio comparativo de las actividades ProTαK y PK, la actividad ProTαK parece corresponderse con una pequeña parte (sobre un 10%) de la cantidad total de la proteína M2, mientras que el resto del contenido celular de la isoenzima M2 se relaciona con la actividad PK. La proteína M2 con actividad ProTαK no posee actividad PK observable y muestra importantes diferencias enzimáticas (respuesta a efectores, cosustratos, etc) respecto a la isoforma M2 con actividad PK en las células NC37.

Por otra parte, de este estudio se deduce que pequeñas diferencias estructurales de la isoforma M2, especialmente aquellas responsables de su afinidad por la ProTα-Sepharosa, serían las causantes del comportamiento diferencial observado en la proteína M2 con actividad ProTαK, en relación a la que posee actividad PK.

### 3. ESTUDIO DE LA BIFUNCIONALIDAD DE LA ISOFORMA M2 DE LA PK

De acuerdo con los resultados expuestos, parece clara una bifuncionalidad celular de la proteína M2 en linfocitos de mamíferos. Por lo tanto, una importante cuestión a resolver era el esclarecimiento del origen de esta bifuncionalidad, mediante la cual la proteína M2 funcionaría como una proteína quinasa (actividad ProTαK) y como una enzima de la glucólisis responsable de la reacción de fosforilación a nivel de sustrato que transforma en ATP la energía del PEP (actividad PK). Por ello, el siguiente paso fue elucidar las características estructurales que podrían inducir esta funcionalidad dual observada en el contenido celular de M2 en las células NC37.

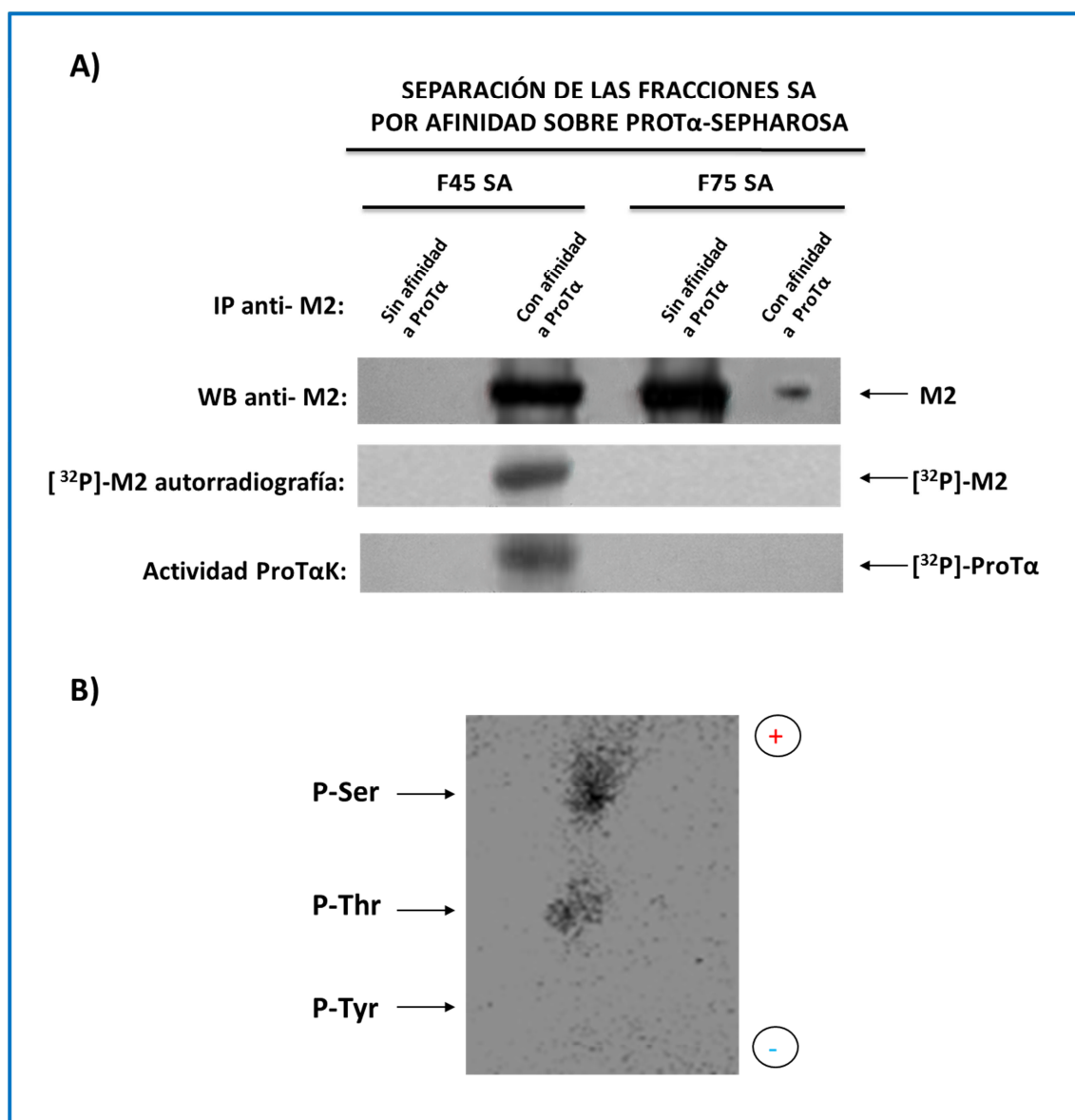
Dos propiedades descritas tanto para la actividad ProTαK como para la actividad PK han servido de base para encaminar nuestra investigación en el estudio de la bifuncionalidad de la isoforma M2. Así, la característica de que la actividad ProTαK es dependiente de un proceso de fosforilación relacionado con la proliferación celular [Pérez-Estévez *et al.*, 2000] y que modificaciones en la estructura cuaternaria de la proteína M2 influyen decisivamente en su actividad PK [revisado en Eigenbrodt *et al.*, 1992; Mazurek *et al.*, 2005; revisado en Mazurek, 2011] orientaron el planteamiento de nuestros experimentos para estudiar la bifuncionalidad de esta proteína.

#### 3.1. Efecto de la fosforilación en la funcionalidad dual de la proteína M2

Para establecer la influencia que la fosforilación pudiera tener en la bifuncionalidad de la proteína M2 y su diferente afinidad por la ProTα, células NC37 fueron marcadas metabólicamente con [<sup>32</sup>P]ortofosfato con el fin de establecer su posible incorporación a la proteína M2 y analizar el comportamiento de la forma fosforilada. Para ello, se prepararon los fraccionados F45 SA y F75 SA de extractos de células marcadas, y se separaron mediante cromatografía de afinidad sobre ProTα-Sepharosa. Las diferentes fracciones fueron inmunoprecipitadas con anti-M2, analizando en los inmunoprecipitados la presencia de proteína M2 y la actividad ProTαK.

Los resultados mostrados en la figura 9A indican que la proteína M2 presente en la F45 SA que muestra afinidad por la ProTα (panel superior) y a su vez posee actividad ProTαK (panel inferior), se corresponde con la forma fosforilada de esta isoenzima (panel medio). Por el contrario, la proteína M2 presente en la F75 SA, sin afinidad por la ProTα y sin actividad ProTαK, no presenta incorporación de [<sup>32</sup>P]ortofosfato.

Para determinar qué aminoácidos están fosforilados en la proteína M2 de la F45 SA, dicha proteína fue inmunoprecipitada, separada mediante SDS-PAGE y transferida a membrana de nitrocelulosa. La banda que contenía la M2-inmunoreactiva se hidrolizó para su análisis de fosfoaminoácidos como se indica en *Material y Métodos* (apartado 3.10). Los resultados de este análisis (figura 9B) indican que los residuos fosforilados en la secuencia de la M2-ProTαK se corresponden con treonina y serina, siendo predominante la fosforilación en residuos de serina.



**Figura 9. Estudio de la fosforilación de la proteína M2. A) Influencia de la fosforilación de la proteína M2 en su afinidad a ProTα-Sepharosa y en su actividad ProTαK.** Lisados de células NC37 marcadas metabólicamente con [<sup>32</sup>P]ortofosfato (400 x 10<sup>6</sup> c.p.m.) fueron precipitados secuencialmente con sulfato amónico (45% y 75%) y cromatografiados en columnas de ProTα-Sepharosa. Componentes en los diferentes fraccionados se inmunoprecipitaron (IP) con anticuerpo anti-M2; y alícuotas de los diversos inmunoprecipitados fueron separadas mediante SDS-PAGE, transferidas a membranas de nitrocelulosa y analizadas con anti-M2 (panel superior) y autorradiografiadas para detectar la M2 [<sup>32</sup>P]-fosforilada (panel medio) o utilizadas para ensayar la actividad ProTαK (panel inferior). **B) Análisis de fosfoaminoácidos de la proteína M2 [<sup>32</sup>P]-fosforilada.** El análisis de fosfoaminoácidos de la [<sup>32</sup>P]-M2 inmunoprecipitada de la F45 SA separada por afinidad a ProTα-Sepharosa fue realizado como se describe en *Material y Métodos* (apartado 3.10.2). Las flechas indican la migración de aminoácidos no marcados: fosfoserina (P-Ser), fosfotreonina (P-Thr) y fosfotirosina (P-Tyr) (detectados usando tinción de ninhidrina).



La espectrometría de masas de la proteína M2 no nos permitió identificar ningún péptido fosforilado que pudiera indicar la posición ni el número de los residuos de serina y treonina fosforilados en la secuencia de M2. Esto pudiera deberse a que no todos los péptidos trípticos generados mediante una digestión en gel de poliacrilamida pueden ser recuperados para su análisis por espectrometría de masas [Villar *et al.*, 2006], tal como se deduce de los diversos análisis de la proteína M2 mostrados en las figuras del *Anexo*.

De acuerdo con los resultados recogidos en la figura 9A, parece claro que la fosforilación de una parte del contenido celular de la proteína M2 es responsable de la habilidad para promover su actividad ProTαK, induciendo su afinidad por la ProTα y su capacidad para fosforilarla. Esta fosforilación parcial de la proteína M2, además de corresponderse con la isoenzima con actividad ProTαK, se sitúa en el orden de magnitud (5-10%) que se ha descrito para la fosforilación de la isoenzima M2 en las células en proliferación [Eigenbrodt *et al.*, 1992].

### **3.2. Influencia de la estructura cuaternaria de la proteína M2 en su bifuncionalidad**

Varios autores han descrito diversas conformaciones cuaternarias para la isoenzima M2, que se corresponden con una forma tetramérica o dimérica de esta proteína y que difieren en sus características cinéticas y función [Eigenbrodt & Glossmann, 1980; Eigenbrodt *et al.*, 1992; revisado en Mazurek, 2007; Shimada *et al.*, 2008; Zwerschke *et al.*, 1999]. Así, la forma tetramérica de la proteína M2 está caracterizada por una gran afinidad por el PEP, mientras que la forma dimérica presenta una afinidad baja por este sustrato y, a la concentración fisiológica de PEP, posee unos niveles de actividad muy disminuidos [Eigenbrodt & Glossmann, 1980; Eigenbrodt *et al.*, 1992; Mazurek *et al.*, 2005; Mazurek, 2007].

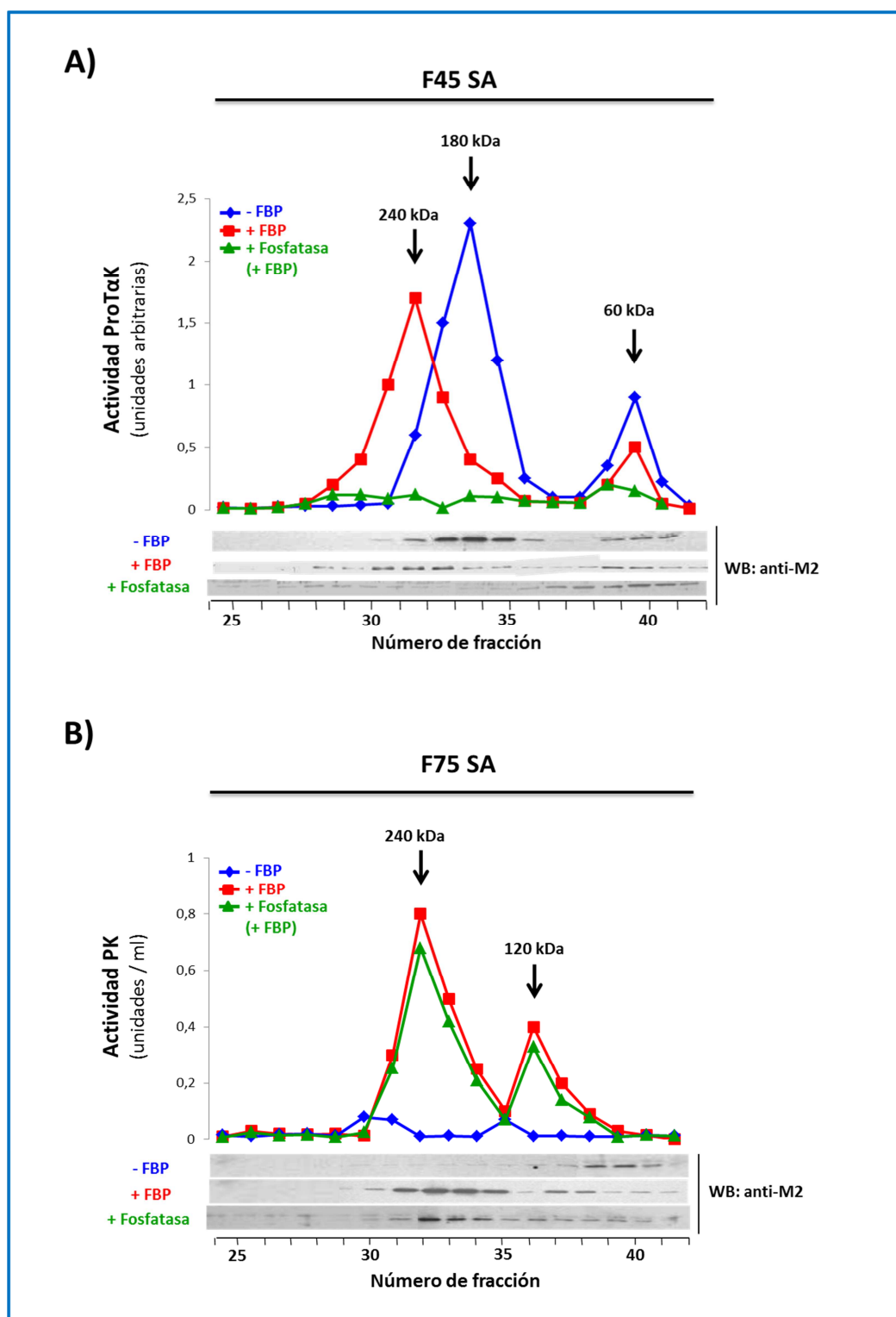
Considerando estos datos, investigamos a continuación la posible relación entre la estructura cuaternaria de la proteína M2 y su encontrada bifuncionalidad. Para ello comparamos las estructuras cuaternarias de la ProTαK y de la PK presentes en las fracciones F45 SA y F75 SA de los extractos de células NC37 mediante su separación por filtración molecular. Este análisis de la estructura cuaternaria fue llevado a cabo en

condiciones en las que estos fraccionados no fueron sometidos a ningún tratamiento, o se trataron con reguladores que se ha demostrado poseen un efecto significativo sobre ambas actividades enzimáticas: la FBP, intermediario glucolítico indispensable para la actividad PK (afectando a la estructura cuaternaria de la isoforma M2 al inducir su reasociación tetramérica) [Ashizawa *et al.*, 1991; Dombrauckas *et al.*, 2005], y el tratamiento con fosfatasa alcalina, que suprime la actividad ProTαK [Pérez-Estévez *et al.*, 2000]. En la filtración molecular fueron analizadas las actividades PK y ProTαK; y la presencia de la proteína M2 fue determinada mediante *Immunowestern blot*.

La elución de la ProTαK en la F45 SA, tratada y sin tratar con FBP o/y con la fosfatasa, se muestra en la figura 10A. En la fracción F45 SA no tratada, la proteína M2 y la actividad ProTαK coeluyen mayoritariamente en las fracciones correspondientes a un tamaño aproximado de 180 kDa, y en una pequeña proporción en un pico común de aproximadamente 60 kDa con baja actividad ProTαK. Este patrón de elución de la actividad ProTαK de la proteína M2 se identifica con una organización trimérica (180 kDa) y monomérica (60 kDa) respectivamente de la M2-ProTαK. Este comportamiento es similar al observado para la actividad ProTαK aislada de linfocitos murinos en proliferación [Pérez-Estévez *et al.*, 1997]. Como también se muestra en la figura 10A, la incubación de la fracción F45 SA con FBP induce una asociación aparentemente tetramérica de la proteína M2-ProTαK (240 kDa), que resulta en una pequeña disminución de su actividad ProTαK. Cuando los componentes de la fracción F45 SA fueron tratados con fosfatasa alcalina, la actividad ProTαK de la proteína M2 fue suprimida (figura 10A), en concordancia con resultados anteriores [Pérez-Estévez *et al.*, 2000], y ésta proteína eluyó como un monómero. Además, la incubación con FBP de esta fracción pre-tratada con fosfatasa (después de eliminar la actividad fosfatasa como se indica en *Material y Métodos* 3.11) no promueve la agregación de la proteína M2, ya que el patrón de elución es similar al de la ProTαK en la fracción F45 SA tratada con fosfatasa (datos no mostrados).

El estudio de la elución de la actividad PK y de la proteína M2 en la fracción F75 SA se muestra en la figura 10B. En contraste con los componentes de la fracción F45 SA, la proteína M2 de la fracción F75 SA no tratada con FBP no muestra actividad PK y eluye como una forma monomérica. La incubación de la fracción F75 SA con FBP restaura y

eleva los niveles de actividad PK, que eluyen como agregados tetraméricos de la proteína M2 (240 kDa), mientras que un pico de baja actividad PK está asociado con la M2-PK en forma dimérica (120 kDa). El comportamiento de la actividad PK se corresponde con lo descrito para la M2-PK en células proliferantes [Eigenbrodt *et al.*, 1992]. Como se indica también en la figura 10B, el patrón de elución de la M2-PK no se altera después del tratamiento con la fosfatasa alcalina en presencia de FBP: ni su estructura cuaternaria ni sus niveles de actividad se ven afectados; tampoco el patrón de elución de la proteína M2 tratada con fosfatasa en ausencia de FBP se ve modificado respecto al observado en la figura 10B (-FBP) (datos no mostrados).



**Figura 10.** Análisis de la influencia de la fosforilación y el tratamiento con FBP sobre la estructura cuaternaria y las actividades ProTαK y PK. Los componentes de los fraccionados F45 SA (**panel A**) y F75 SA (**panel B**), tratados con y sin fosfatasa o/y FBP, se separaron mediante filtración en gel, y la actividad ProTαK y PK en las diferentes y respectivas fracciones se ensayó como se indica en *Material y Métodos* (apartados 3.3.1 y 3.7.1). La presencia de la proteína M2 se determinó analizando alícuotas de las distintas fracciones mediante SDS-PAGE y *Western blot* con anti-M2.

De acuerdo con estos resultados, la fosforilación de una pequeña parte (sobre un 10%) del contenido celular de la proteína M2 en residuos de serina y treonina parece ser esencial para inducir su actividad ProTαK. Esta fosforilación también permite asociaciones cuaternarias y ternarias de la M2-ProTαK que favorecen una actividad más elevada que la mostrada por las formas monoméricas de la M2-ProTαK fosforilada. Sin embargo, no puede descartarse que otros efectores celulares, de forma similar a como ocurre con la FBP, puedan también cooperar en la asociación oligomérica de la proteína M2 para incrementar la actividad de la M2-ProTαK monomérica. La desfosforilación de la isoforma M2 anula su actividad ProTαK y previene cualquier estructura cuaternaria asociada. En contraste, la proteína M2 que mantiene la actividad PK (aproximadamente un 90% del total) no es afectada por el proceso de fosforilación y, con una actividad dependiente de concentraciones fisiológicas de FBP, presenta una estructura cuaternaria con dos formas: tetramérica, la más activa y abundante, y dimérica, menos activa y abundante.

## 4. INVESTIGACIÓN DEL COMPORTAMIENTO CELULAR DE LA PROT $\alpha$ EN RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD PROT $\alpha$ K Y LA PROTEÍNA M2

La finalidad de este estudio fue la demostración de la capacidad de la ProT $\alpha$  para interactuar *in vivo* con la proteína M2, como prueba significativa de su relación funcional, así como establecer si el resultado de esa interacción *in vivo* propiciaba la fosforilación de la ProT $\alpha$  en los mismos residuos de su secuencia que los fosforilados por la M2-ProT $\alpha$ K en su reacción *in vitro* con dicha proteína.

### 4.1. Determinación de la interacción *in vivo* entre la proteína M2 y la ProT $\alpha$ en células en proliferación

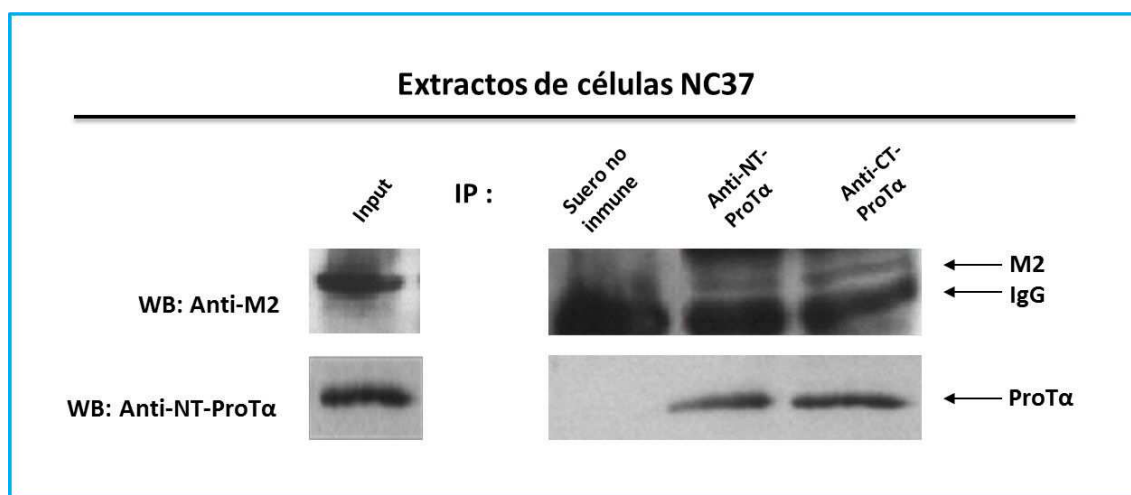
Para demostrar la interacción entre la proteína M2 y la ProT $\alpha$  en células en proliferación, se realizaron experimentos de coimmunoprecipitación en extractos de células NC37 y de células 293T transfectadas con vectores de expresión de la ProT $\alpha$ .

La inmunoprecipitación de extractos citosólicos de células NC37 fue llevada a cabo con anticuerpos anti-ProT $\alpha$  generados contra epitopos de su secuencia localizados en los segmentos N- (anti-NT-ProT $\alpha$ ) o C-terminal (anti-CT-ProT $\alpha$ ) y purificados por afinidad a ProT $\alpha$ -Sepharosa (*Material y Métodos* 3.9.1). Además, debido a la dificultad para retener a la ProT $\alpha$  en los diferentes tipos de membranas empleadas en *Inmunowestern blot*, a causa de su carácter extremadamente ácido [Eschenfeldt & Berger, 1986; Goodall *et al.*, 1986; Frangou-Lazaridis *et al.*, 1988; Panneerselvam *et al.*, 1988; Schmidt & Werner, 1991] y su pequeño tamaño de aproximadamente 12 kDa [Haritos *et al.*, 1985a], utilizamos un procedimiento específico para detectar esta proteína en los diversos inmunoprecipitados. Así, la transferencia específica de la ProT $\alpha$  inmunoprecipitada se realizó a membranas de nitrocelulosa activadas mediante el tratamiento con 1% glutaraldehído (*Material y Métodos* 3.9.2). El análisis de la presencia de la proteína M2 fue llevado a cabo en alícuotas de las proteínas

coimmunoprecipitadas que se transfirieron a membranas sin tratar de nitrocelulosa para su posterior inmunodetección (*Material y Métodos* 3.9.3).

El análisis del material inmunoprecipitado indica que ambos anticuerpos coimmunoprecipitan un complejo de la ProTα unida a la proteína M2 (figura 11).

Aunque la baja inmunoreactividad de los anticuerpos anti-ProTα [Covelo *et al.*, 2006] dificultó una exacta evaluación de la cantidad de proteína que inmunoprecipitaba con la ProTα, la cuantificación densitométrica de la proteína M2 coimmunoprecipitada con los anticuerpos anti-NT-ProTα y anti-CT-ProTα (figura 11) indica que ésta comprende aproximadamente un 5-10% del total de la M2 citosólica. Este porcentaje se corresponde con la cantidad de la proteína M2 que, en extractos de células NC37, presenta afinidad por la ProTα-Sepharosa (figura 3).



**Figura 11. Coimmunoprecipitación de la ProTα y la proteína M2 en células NC37.** Extractos citosólicos (3 mg) fueron incubados con 20 µl de suero no inmune, con 20 µg de anticuerpo anti-NT-ProTα o con 20 µg de anticuerpo anti-CT-ProTα. Alícuotas (1/2 del volumen final) del material inmunoprecipitado fueron separadas por SDS-PAGE, transferidas a membranas de nitrocelulosa e incubadas con anticuerpo anti-M2 (panel superior) o con anticuerpo anti-NT-ProTα sobre membranas de nitrocelulosa activadas con 1% glutaraldehído (panel inferior), respectivamente (*Material y Métodos* 3.9.2 y 3.9.3). El *input* se corresponde a un análisis similar de 40 µg de extracto citosólico crudo de células NC37 incubado con anti-M2 o anti-NT-ProTα.

Continuando el estudio de la habilidad de interacción *in vivo* entre la ProTα y la proteína M2, utilizamos un vector de expresión de la ProTα recombinante derivado del plásmido pcDNA 3.1 (con una elevada estabilidad y empleado para la expresión transitoria en células de mamíferos) en el que se había insertado el cDNA de la ProTα y que además poseía una secuencia codificadora de 6 histidinas en el extremo N-terminal de la proteína y la secuencia EQKLISEEDL del péptido c-myc en el extremo C-terminal (tal como se indica en *Material y Métodos* 1.4).

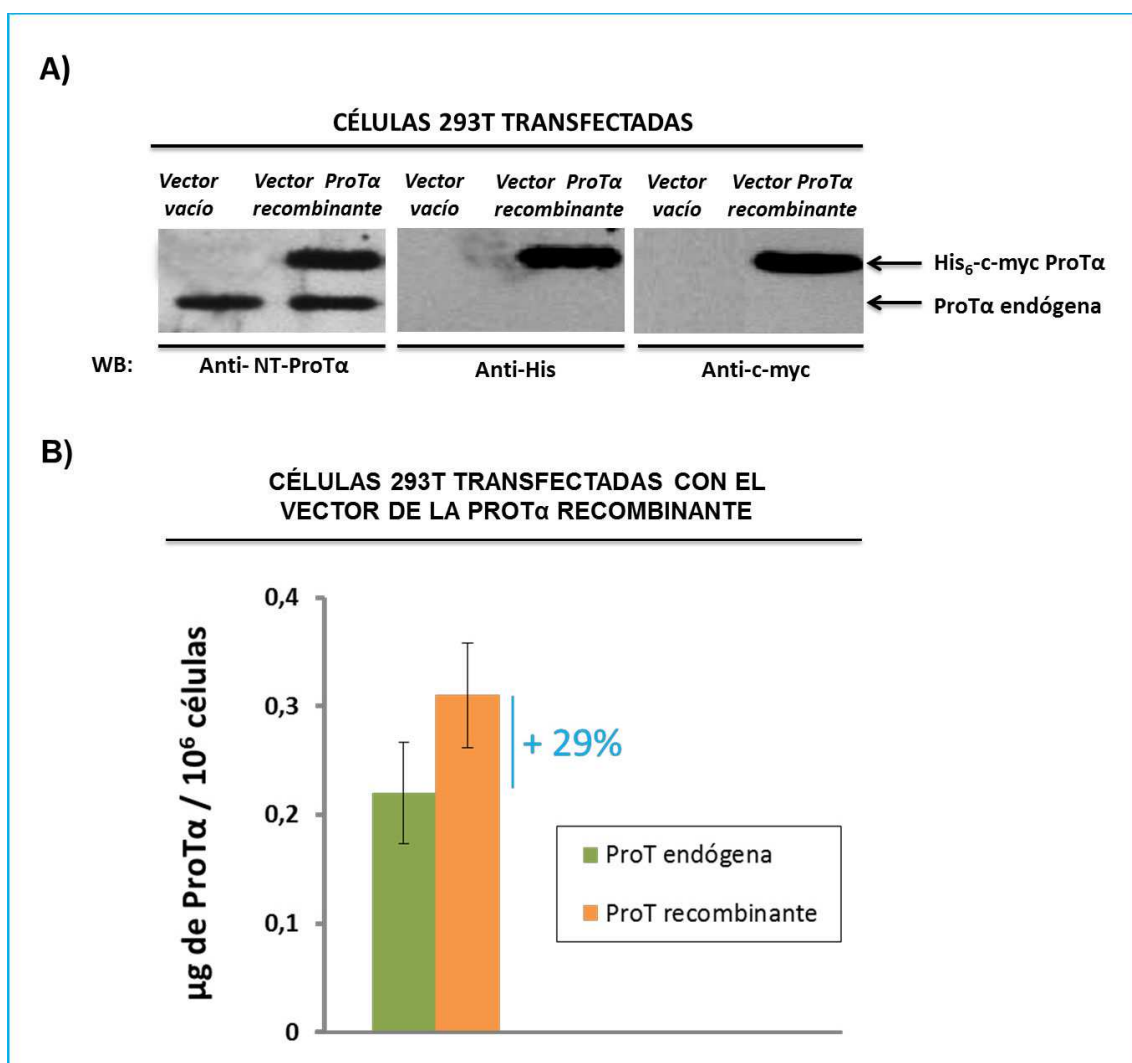
Este vector fue transfectado en células 293T y la presencia de la ProTα recombinante fue analizada en los extractos celulares mediante *Immunowestern blot*. Para la inmunodetección de la ProTα recombinante expresada se utilizaron dos anticuerpos capaces de reconocer los péptidos añadidos en los extremos de la proteína: los 6 residuos de histidina y el péptido c-myc (a.a. 410-419). Además, se ensayaron los anticuerpos anti-NT-ProTα y anti-CT-ProTα para el reconocimiento de la ProTα recombinante y la ProTα nativa (endógena).

Un análisis preliminar demostró que el anticuerpo anti-CT-ProTα no era capaz de reconocer la ProTα recombinante (datos no mostrados), posiblemente a causa de la nueva y diferente conformación adquirida por el extremo C-terminal de la proteína al añadirle el péptido c-myc.

Sin embargo, tal como se muestra en la figura 12A, el anticuerpo anti-NT-ProTα fue capaz de reconocer y diferenciar la ProTα nativa de la recombinante como dos bandas de diferente movilidad electroforética, como consecuencia del mayor tamaño de la His<sub>6</sub>-c-myc ProTα.

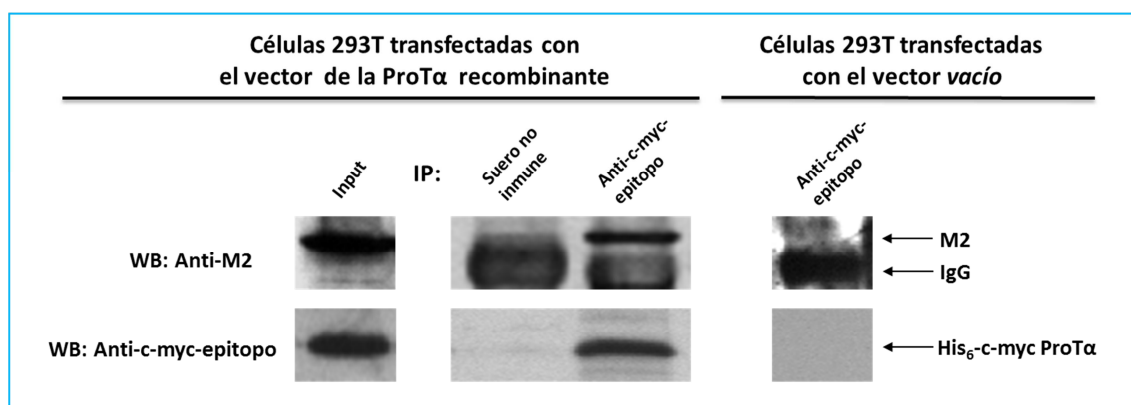
En la figura 12B se presenta la cuantificación densitométrica de los niveles de expresión de la ProTα nativa y recombinante en las células 293T, obtenidos de los análisis por *Immunowestern blot* empleando el anticuerpo anti-NT-ProTα. De acuerdo con estos resultados, los niveles de expresión de la ProTα recombinante exceden aproximadamente en un 30% a los niveles de la ProTα endógena expresada en las células 293T.





**Figura 12. Análisis de la expresión de la ProTα recombinante en células 293T.** **A)** Alícuotas (40 µg) de los extractos de células 293T transfectadas con el vector *vacío* o con el vector de la ProTα recombinante fueron separadas mediante SDS-PAGE e inmunodetectadas con el anticuerpo anti-NT-ProTα, con el anticuerpo anti-His y con el anticuerpo anti-c-myc respectivamente (ver tabla de Anticuerpos en *Material y Métodos*). **B)** Cuantificación de los niveles de expresión de la ProTα endógena y recombinante en las células 293T. Las barras representan los µg/10<sup>6</sup> células de la ProTα endógena o recombinante, calculados como el valor medio del análisis densitométrico de los respectivos *Immunowestern blots* de los extractos de células 293T transfectadas (utilizando el anticuerpo anti-NT-ProTα para su detección). En la figura se señala además el porcentaje en el que la expresión de la ProTα recombinante excede de la nativa. Las líneas de error indican la  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes.

Con el fin de confirmar la interacción *in vivo* de la ProTα con la proteína M2, los extractos de células 293T en los que se había expresado la ProTα recombinante fueron inmunoprecipitados con anticuerpos contra el epítopo c-myc: llevamos a cabo esta estrategia con la finalidad de inmunoprecipitar complejos ProTα-M2 empleando un anticuerpo capaz de reconocer a la ProTα recombinante de forma muy efectiva. Como se indica en la figura 13, el análisis del material inmunoprecipitado corroboró la presencia de complejos ProTα-M2 en células 293T.



**Figura 13. Coinmunoprecipitación de la ProTα recombinante y la proteína M2 en células 293T transfectadas.** Lisados (1.5 mg) de células 293T transfectadas con el vector de expresión de la His<sub>6</sub>-c-myc ProTα o con el vector *vacío* fueron inmunoprecipitados con 20 µl de suero no inmune o con 8.5 µg de anticuerpo anti-c-myc epitopo. Alícuotas (1/2) del material inmunoprecipitado fueron separadas mediante SDS-PAGE, transferidas a membranas de nitrocelulosa e incubadas con anticuerpo anti-M2 (panel superior) o con anticuerpo anti-c-myc-epitopo sobre membranas de nitrocelulosa activadas con 1% glutaraldehído (panel inferior), respectivamente (*Material y Métodos* 3.9.2 y 3.9.3) El *input* se corresponde con el análisis de 40 µg de lisado crudo de células 293T.

#### 4.2. Estudio de la actividad M2-ProTαK *in vitro* e *in vivo* e identificación de los lugares de fosforilación de la ProTα

A continuación investigamos si la actividad catalítica *in vitro* de la M2-ProTαK se correspondía con la encontrada *in vivo* para esta enzima. Con esta finalidad, realizamos un análisis de los lugares de fosforilación de la ProTα fosforilada *in vitro* por la ProTαK y de la ProTα aislada de células NC37. La ProTα separada mediante SDS-PAGE de la mezcla de reacción de la ProTαK y la ProTα purificada de extractos de

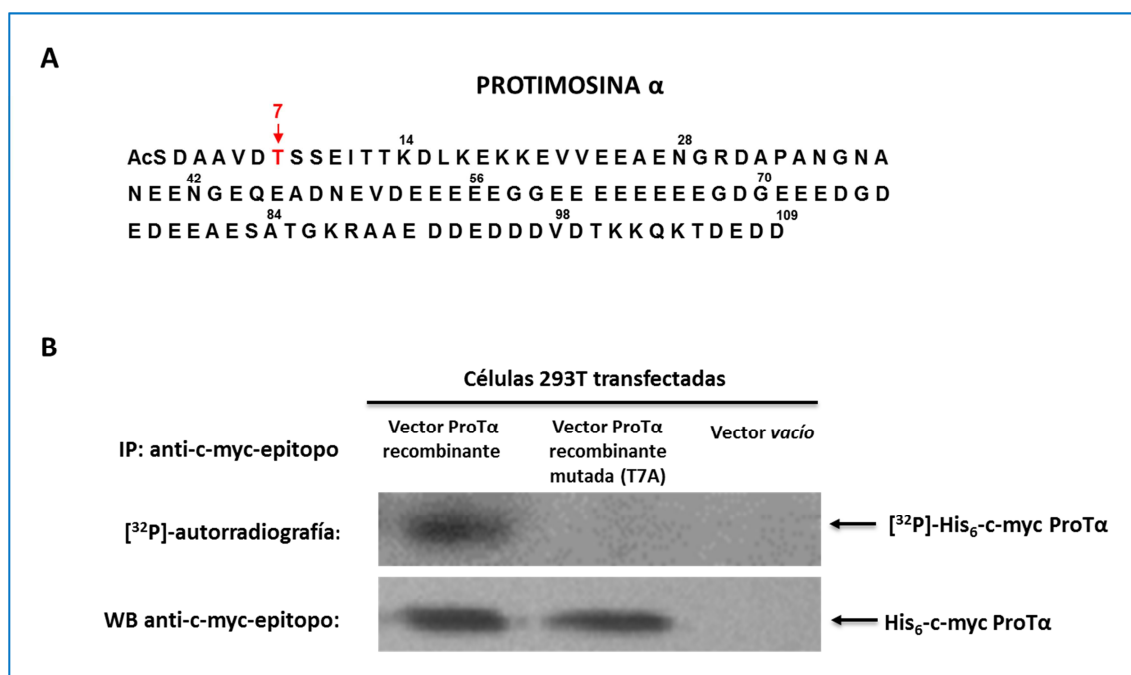
células NC37 fueron analizadas por espectrometría de masas. Este análisis fue realizado considerando que, de acuerdo con resultados previos de nuestro laboratorio, los lugares de fosforilación de la ProTα se localizan en su región N-terminal [Pérez-Estévez *et al.*, 1997].

El resultado del análisis espectrométrico (figura 4 del *Anexo*) indicó que en ambas muestras la ProTα aparece fosforilada en un residuo de treonina localizado en la posición 7 de su secuencia (remarcada en la figura 14A), lo que demuestra la coincidencia de la actividad catalítica *in vitro* de la ProTαK purificada de células NC37 con la encontrada *in vivo* en estas células.

Este lugar de fosforilación coincide con el observado en esplenocitos de ratón, aunque en estas células (activadas con ConA y IL-2), residuos de treonina localizados en posición 12 o 13 son también fosforilados *in vivo* e *in vitro* por la ProTαK murina [Pérez-Estévez *et al.*, 1997].

Para corroborar la fosforilación de la ProTα en la treonina 7, utilizamos el vector de expresión pcDNA 3.1 de la ProTα recombinante (indicado en el apartado 4.1) en la que se introdujo una mutación sustituyendo el residuo de treonina 7 por alanina (T7A). La actividad de expresión de este vector en las células 293T fue similar a la del vector de la ProTα recombinante nativa, con un nivel de expresión un 25% superior al de la ProTα endógena (datos no mostrados).

Los vectores que expresaban la ProTα T7A y la ProTα no mutada fueron transfectados en células 293T, y dichas células marcadas con [<sup>32</sup>P]ortofosfato. La incorporación de [<sup>32</sup>P]ortofosfato en la secuencia de la ProTα recombinante fue determinada en los inmunoprecipitados obtenidos con anticuerpo anti-c-myc epitopo a partir de lisados de células transfectadas. Como indica la figura 14B, solamente la ProTα recombinante no mutada es fosforilada en células 293T, mientras que la ProTα mutada no muestra incorporación de [<sup>32</sup>P]ortofosfato, confirmando que la treonina en posición 7 es el único lugar de fosforilación de la ProTα también en estas células.



**Figura 14. Estudio de los sitios de fosforilación de la ProT $\alpha$  *in vivo* e *in vitro*. A) Secuencia de la ProT $\alpha$  humana indicando la treonina 7 en la que es fosforilada esta proteína en células NC37 por la M2-ProT $\alpha$ K. B) Fosforilación de la ProT $\alpha$  recombinante en células 293T. Las células transfectadas con el vector de la ProT $\alpha$  recombinante no mutada y mutada (ProT $\alpha$  T7A) y con el vector *vacío* fueron marcadas metabólicamente con [<sup>32</sup>P]ortofosfato. Los extractos de las células 293T ( $1-1.2 \times 10^7$  células) fueron cromatografiados sobre columnas de Ni-agarosa, y los eluatos preincubados con suero no inmune e inmunoprecipitados con anti-cmyc-epitopo, tal como se indica en *Material y Métodos* (apartados 3.8.5 y 3.9.6.ii). Alícuotas (1/2) del material inmunoprecipitado fueron separadas mediante SDS-PAGE, transferidas y sometidas a un análisis autorradiográfico para la detección de la ProT $\alpha$  radiactiva ([<sup>32</sup>P]-His<sub>6</sub>-c-myc-ProT $\alpha$ ) (panel superior) o transferidas e incubadas con anticuerpo anti-c-myc epitopo para confirmar la presencia de la ProT $\alpha$  recombinante (panel inferior).**

## 5. ESTUDIO PRELIMINAR DEL EFECTO BIOLÓGICO DE LA FOSFORILACIÓN DE LA PROT $\alpha$

Planteamos este estudio con el objeto de aportar conocimiento a la transcendencia biológica que el proceso de fosforilación de la ProT $\alpha$  puede tener en su función celular. En él se propone investigar la repercusión de dicha fosforilación en dos de los procesos celulares en los cuales la implicación de la ProT $\alpha$  está bien documentada: la proliferación y la apoptosis celular.

La proliferación celular propicia la migración de la ProT $\alpha$  al núcleo, participando en la remodelación de la cromatina a través de su interacción con las histonas, con sus metiltransferasas y acetiltransferasas, y afectando al ensamblado de los nucleosomas [Díaz-Jullien *et al.*, 1996; Covelo *et al.*, 2006; Gómez-Márquez & Rodríguez., 1998; Freire *et al.*, 2001; Karetsoy *et al.*, 2004; Zakharova *et al.*, 2011]. Además, mostrando una capacidad multifuncional, la ProT $\alpha$  previene la actividad apoptótica celular bloqueando la activación citoplasmática de la caspasa 9 mediada por el apoptosoma [Jiang *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2010], un complejo multiproteico formado por la proteína adaptadora Apaf-1, el citocromo c liberado de la mitocondria como consecuencia de los estímulos apoptóticos y la propia caspasa 9.

Para determinar como la fosforilación de la ProT $\alpha$  influye en estos mecanismos, empleamos el vector de expresión de la ProT $\alpha$  en el que se había mutado la treonina 7 del lugar único de fosforilación por alanina (ProT $\alpha$  T7A). Los resultados de los experimentos diseñados con tal finalidad se detallan a continuación.

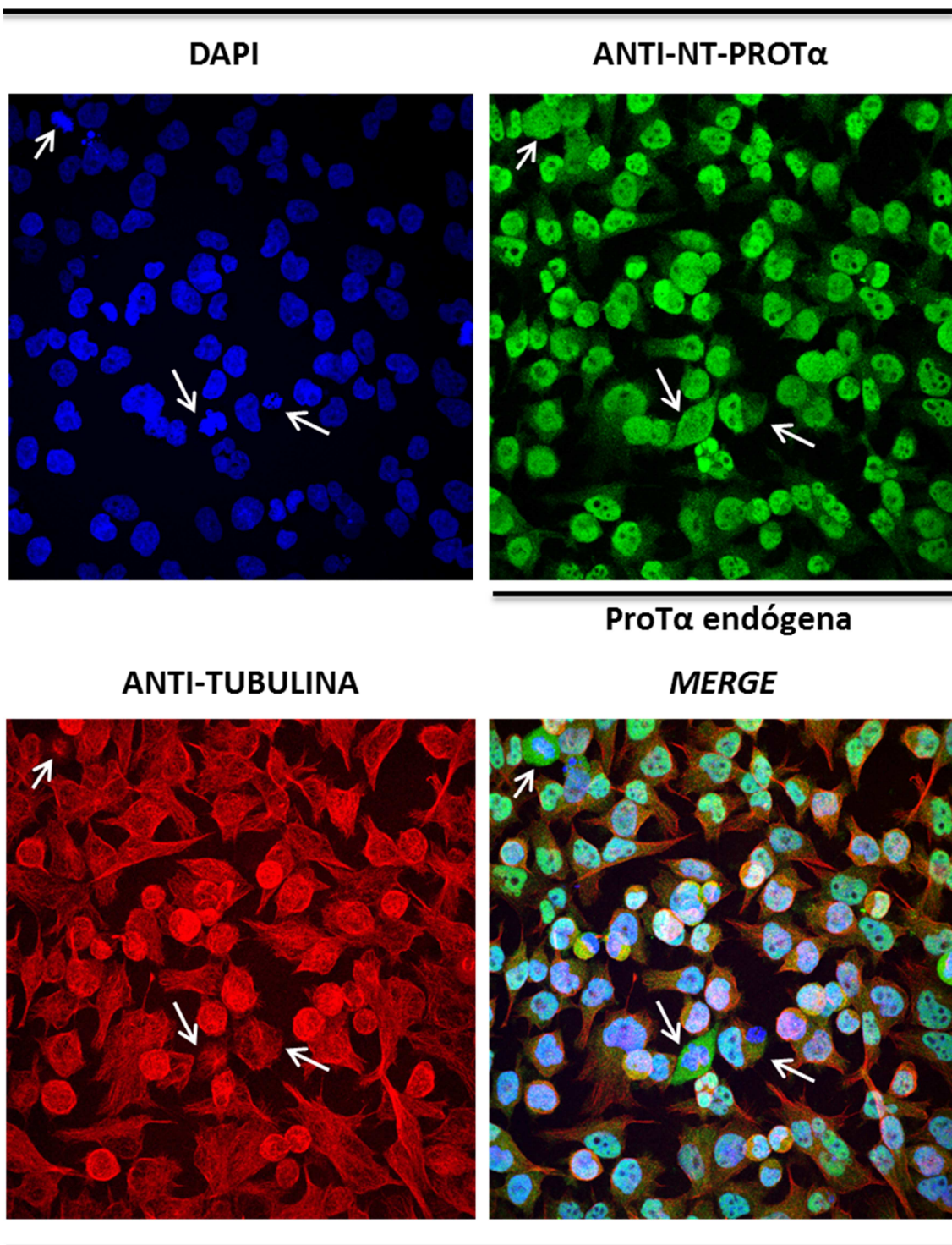
### 5.1. Estudio de la influencia de la fosforilación de la ProT $\alpha$ en su migración al núcleo de células en proliferación

En este estudio nos propusimos el análisis microscópico del comportamiento celular de la ProT $\alpha$  endógena y de la ProT $\alpha$  recombinante mutada (T7A) y no mutada expresadas en células HeLa en las que se han transfectado los respectivos vectores de expresión,

una línea celular que por razones morfológicas y de crecimiento encontramos muy útil para este tipo de experimentos.

Así, los ensayos de migración nuclear de la ProT $\alpha$  endógena (figura 15) se llevaron a cabo en células HeLa en proliferación con una confluencia aproximada del 60-70%. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI (panel superior izquierda) y la ProT $\alpha$  fue reconocida mediante un anticuerpo anti-NT-ProT $\alpha$  (panel superior derecha). Para la comprobación de la morfología celular se empleó anticuerpo anti-tubulina (panel inferior izquierda). La imagen *merge* (panel inferior derecha) consiste en la superposición de las 3 anteriores.

Como indica la figura 15, los análisis de la localización celular de la ProT $\alpha$  endógena mediante microscopía confocal de fluorescencia muestran una distribución nuclear para esta proteína (excluyéndose de los nucleolos) en las células en interfase (las imágenes superpuestas demuestran que la ProT $\alpha$  ocupa el mismo área que el DNA teñido con DAPI); aunque una pequeña cantidad de la ProT $\alpha$  puede observarse también en el citoplasma celular y concentrada especialmente en las áreas perinucleares. Por el contrario, las células en mitosis (señaladas con flechas blancas en la figura) difieren cualitativamente del resto: la ProT $\alpha$  endógena aparece más difusa, su localización es extranuclear y se separa de los cromosomas condensados. Esta percepción se refuerza con las imágenes superpuestas, en las que se aprecia claramente que la ProT $\alpha$  se excluye considerablemente del volumen ocupado por el DNA teñido, confirmando los resultados previos de otros autores que indicaban la liberación citoplasmática de esta proteína durante la mitosis [Vareli *et al.*, 1996; Vareli & Frangou-Lazaridis, 2004].



**Figura 15. Estudio de la localización subcelular de la ProTα endógena en células HeLa mediante microscopía de inmunofluorescencia.** Monocapas semiconfluentes de células HeLa fueron fijadas y sometidas a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos anti-tubulina (rojo) y anti-NT-ProTα (verde), tal como se indica en *Material y Métodos* (3.13). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). La imagen *merge* consiste en una superposición de las otras 3. Cada experimento se reprodujo, al menos, 3 veces y las células mostradas en las imágenes son representativas de los efectos observados para las condiciones ensayadas.

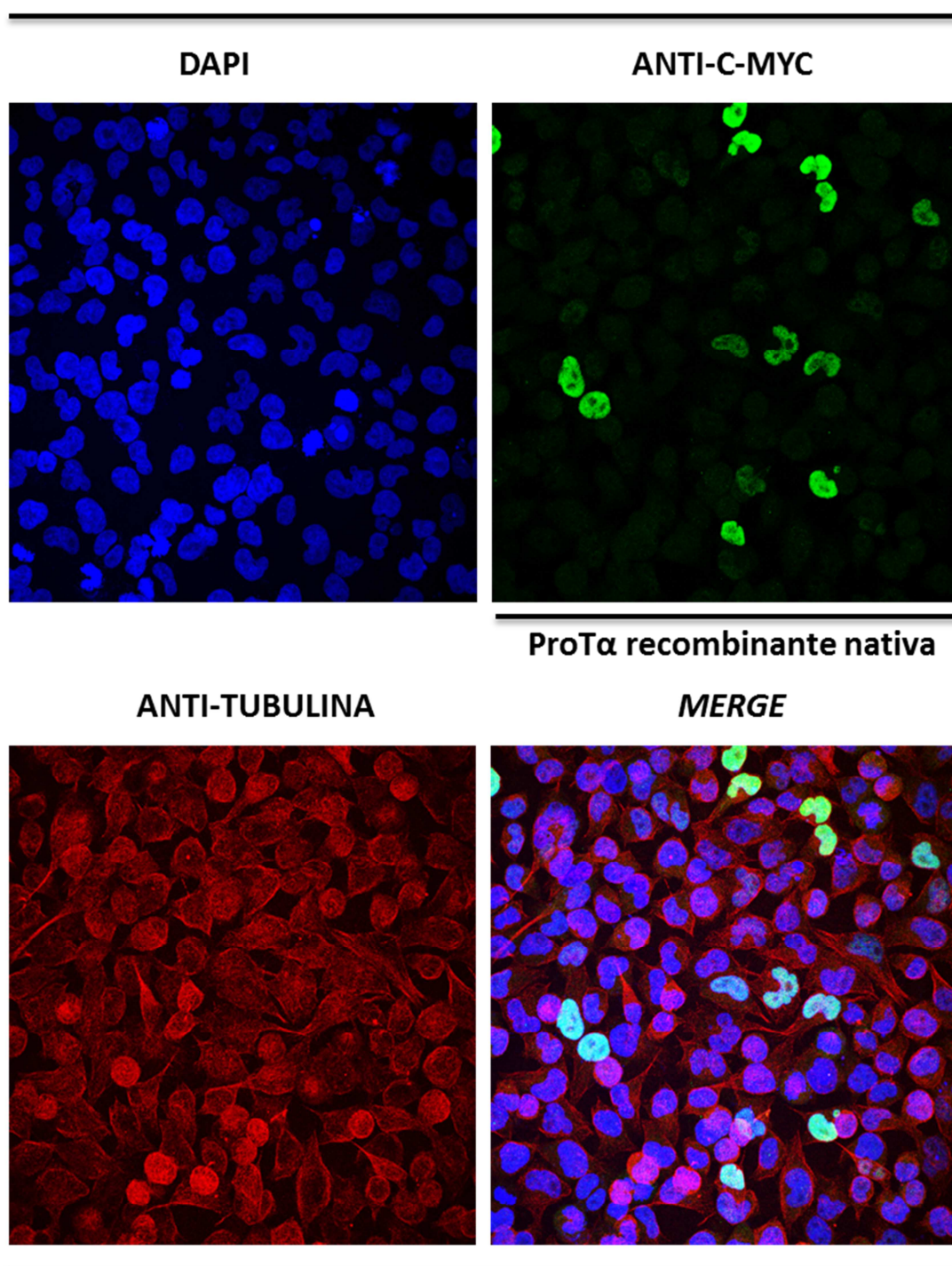
Para resolver la influencia de la fosforilación de la ProTα en su capacidad para migrar al núcleo y su localización subcelular, llevamos a cabo el análisis por microscopía de la distribución celular de la ProTα recombinante no mutada y mutada (T7A) en células HeLa en proliferación transfectadas con el vector de expresión correspondiente.

En la figura 16 se observa la localización de la ProTα recombinante capaz de fosforilarse en las células transfectadas, mediante el uso de anticuerpo anti-c-myc (panel superior derecha; el resto de los paneles de la imagen se corresponden con las condiciones ya indicadas para la figura 15). Los resultados de este análisis muestran que la ProTα recombinante no mutada se comporta de forma similar a la ProTα endógena: migra principalmente al núcleo de células en crecimiento (la ProTα sobreexpresada colorea los núcleos de manera uniforme) sin incluirse en los nucleolos. Así, las imágenes superpuestas ilustran de forma manifiesta la coincidencia exacta entre la distribución celular del DNA teñido y de la ProTα no mutada reconocida con el anticuerpo anti-c-myc.

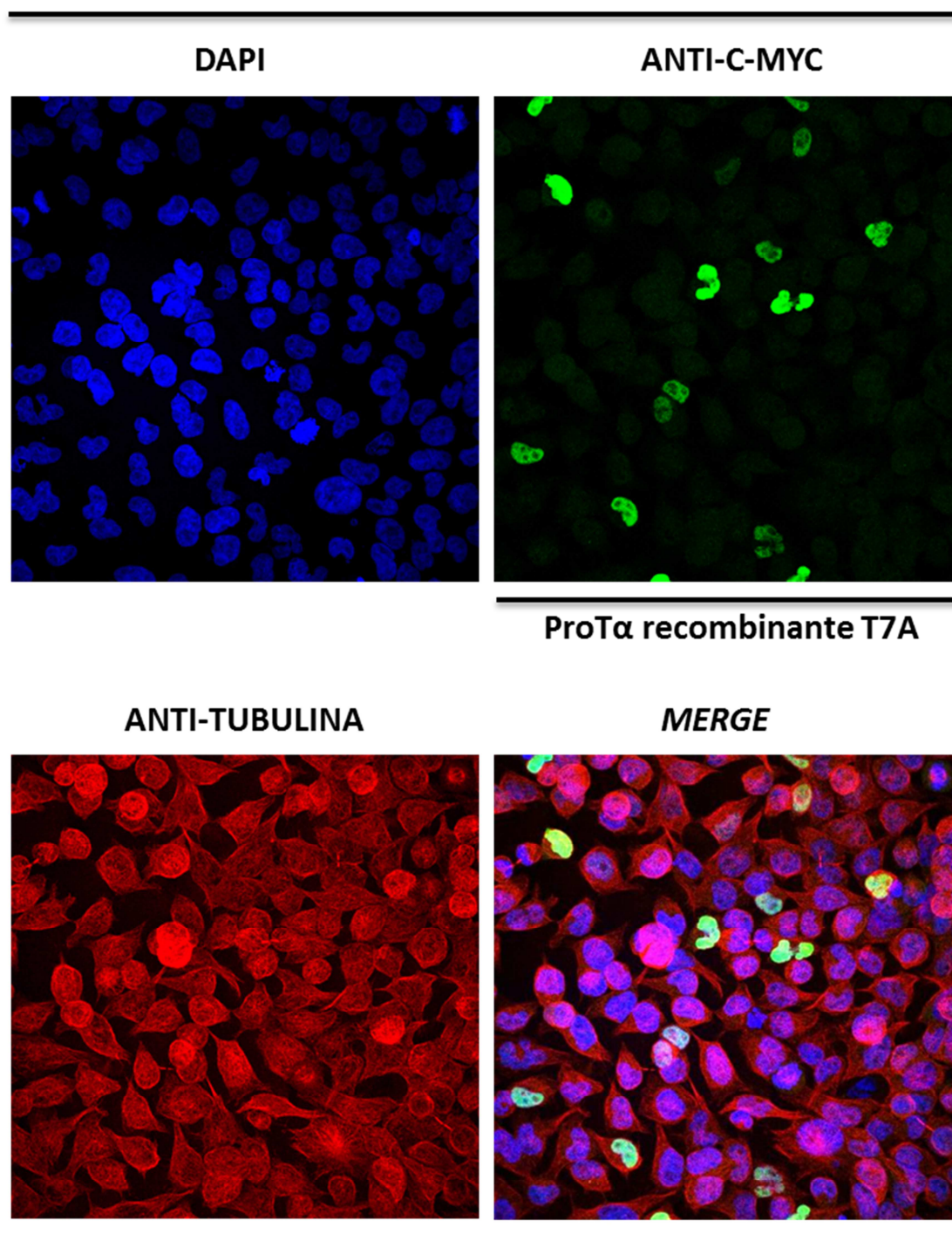
Por último, estudiamos la localización intracelular de la ProTα recombinante mutada, para lo cual las células HeLa en proliferación fueron transfectadas con el vector de expresión de la ProTα T7A. Este análisis mediante microscopía confocal de fluorescencia se presenta en la figura 17 (las características de los paneles que la conforman son similares a las descritas para la figura anterior): no se aprecian diferencias en la movilidad celular de la ProTα mutada (T7A) respecto a la no mutada y a la ProTα endógena: se distribuye en el núcleo de las células proliferantes en su práctica totalidad y, como en los dos casos anteriores no se localiza en los nucleolos (que permanecen libres de la ProTα en todas las condiciones estudiadas).

Los resultados de estos experimentos concluyen que la mutación en el residuo de treonina 7 por alanina en la secuencia de la ProTα (que impide su fosforilación) no tiene un efecto directo en la localización nuclear de la proteína y, por lo tanto, su migración en la célula parece ser independiente de la fosforilación en dicho aminoácido.





**Figura 16. Estudio de la localización subcelular de la ProTα recombinante nativa en células HeLa mediante microscopía de inmunofluorescencia.** Monocapas semiconfluentes de células HeLa fueron transfectadas con el vector de expresión de la ProTα recombinante nativa y, a las 48 horas, fijadas y sometidas a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos anti-tubulina (rojo) y anti-c-myc (verde), según se indica en *Material y Métodos* (3.13). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). La imagen *merge* consiste en una superposición de las otras 3. Cada experimento se reprodujo, al menos, 3 veces y las células mostradas en las imágenes son representativas de los efectos observados para las condiciones ensayadas.



**Figura 17. Estudio de la localización subcelular de la ProTα recombinante mutada (T7A) en células HeLa mediante microscopía de inmunofluorescencia.** Monocapas semiconfluentes de células HeLa fueron transfectadas con el vector de expresión de la ProTα recombinante mutada (T7A) y, a las 48 horas, fijadas y sometidas a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos anti-tubulina (rojo) y anti-c-myc (verde), según se indica en *Material y Métodos* (3.13.). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). La imagen *merge* consiste en una superposición de las otras 3. Cada experimento se reprodujo, al menos, 3 veces y las células mostradas en las imágenes son representativas de los efectos observados para las condiciones ensayadas.

## 5.2. Estudio de la influencia de la fosforilación de la protimosina $\alpha$ en su actividad antiapoptótica

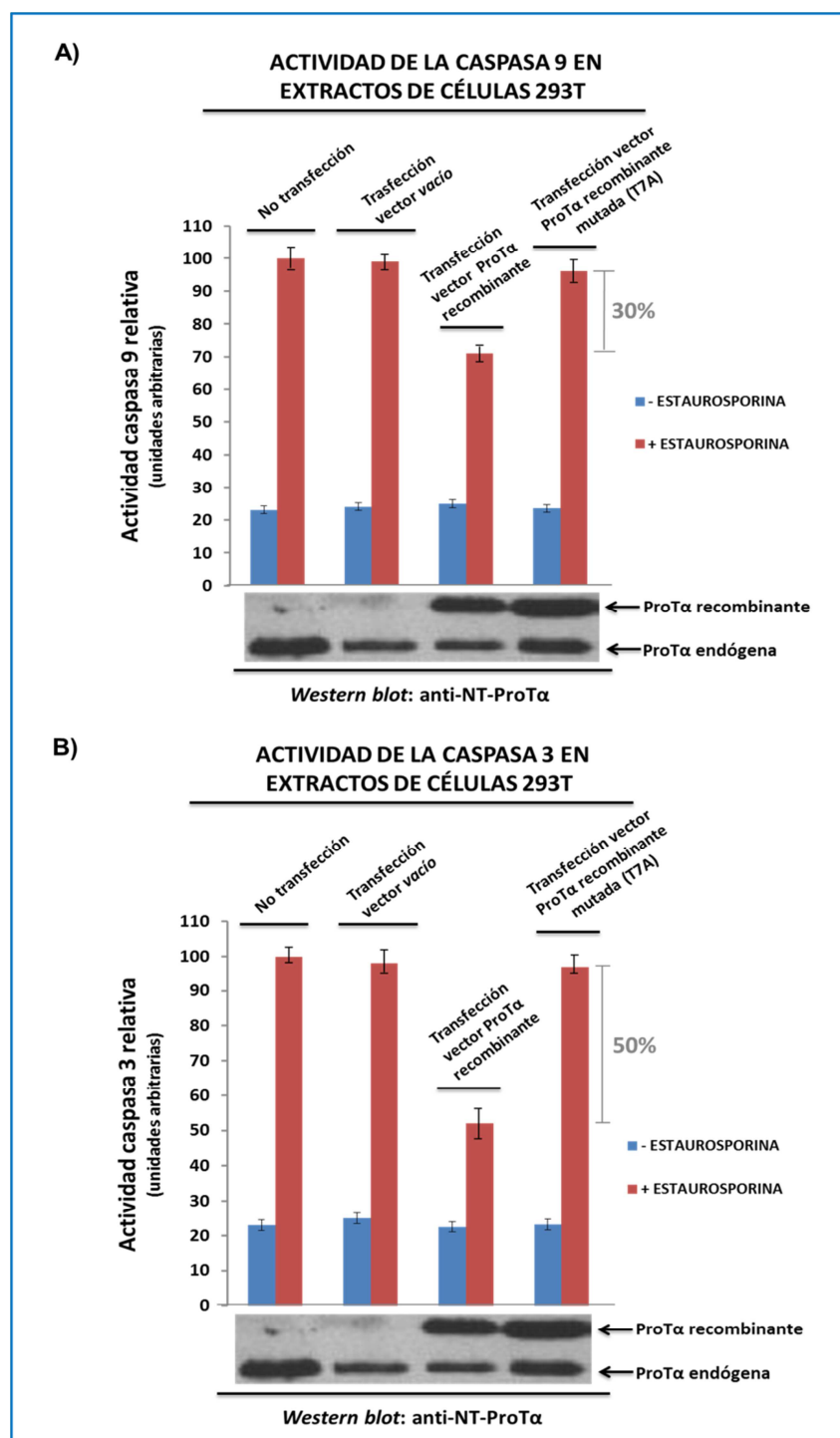
Con la finalidad de establecer la influencia que la fosforilación de la ProT $\alpha$  pudiera tener sobre la actividad apoptótica celular, investigamos su efecto sobre la actividad de las caspasas dependientes del apoptosoma.

Para ello, los vectores de expresión de la ProT $\alpha$  recombinante no mutada y mutada en su lugar de fosforilación treonina 7 (T7A), indicados en los apartados 4.1 y 4.2, fueron transfectados en células 293T. Después de 24 horas se indujo la apoptosis celular mediante el tratamiento con estaurosporina.

La influencia sobre la actividad apoptótica fue evaluada determinando el efecto de la expresión de la ProT $\alpha$  no mutada y mutada (T7A) sobre la actividad de la caspasa 9 (reflejo de la activación del apoptosoma) y de la caspasa 3 (inducida por la activación de la propia caspasa 9). Paralelamente, en los diferentes lisados de las células 293T transfectadas se estimaron los niveles de expresión de la ProT $\alpha$  endógena y de la ProT $\alpha$  recombinante, no mutada y mutada (T7A), mediante *Inmunowestern blot*.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 18, y en ellos se aprecia una disminución de las actividades de las caspasa 9 (panel A) y la caspasa 3 (panel B) de un 30% y un 50%, respectivamente, en células 293T en las que se ha inducido la sobreexpresión de la ProT $\alpha$  recombinante no mutada con capacidad para fosforilarse y en las que posteriormente se estimuló la apoptosis mediante la incubación con estaurosporina. Sin embargo, la sobreexpresión en células 293T apoptóticas de la ProT $\alpha$  recombinante mutada (T7A), sin capacidad para ser fosforilada, restablece unos niveles de actividad para ambas caspasas similares a los observados en las células transfectadas con el vector *vacío* o en las células control (sin transfectar).

Estos resultados parecen indicar que la ProT $\alpha$  no fosforilada no posee actividad antiapoptótica en las células 293T, es decir, que su función en la apoptosis celular bloqueando la actividad del apoptosoma [Jiang *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2010] sería dependiente de la fosforilación en su residuo de treonina 7.



**Figura 18. Efecto de la sobreexpresión de la ProTα sobre las actividades caspasa 3 y caspasa 9 en células 293T transfectadas y tratadas con estaurosporina.** Las células 293T, 24 horas después de la transfección, fueron tratadas con estaurosporina  $1\mu\text{M}$  durante 4 horas para su inducción apoptótica. A continuación, fueron lisadas ( $5 \times 10^6$  células) y las actividades caspasa 9 (**panel A**) o caspasa 3 (**panel B**) ensayadas (*Material y Métodos* apartado 3.14). En la parte inferior de los paneles se presenta el análisis por *Immunowestern blot* de los respectivos lisados de las células 293T, transfectadas con los vectores indicados, usando anti-NT-ProTα para la detección de la ProTα endógena y de la ProTα recombinante no mutada y mutada (T7A). Las líneas de error indican la  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes.

## **DISCUSIÓN**



## V. DISCUSIÓN

Los datos presentados en esta tesis proporcionan evidencias de una nueva propiedad de la piruvato quinasa (PK) (E. C. 2. 7. 1. 40), enzima clave en la producción celular de energía mediante el catabolismo de la glucosa independiente de oxígeno.

Específicamente, estos resultados indican que la isoforma M2 de la PK es enzimáticamente bifuncional, mostrando función glucolítica y proteína quinasa [Díaz-Jullien *et al.*, 2011]. En otras palabras, la función caracterizada previamente de esta proteína de acoplar la energía liberada de la hidrólisis del PEP para sintetizar ATP y generar piruvato, se ve modificada a una actividad enzimática totalmente distinta, en la que sus sustratos habituales PEP y ADP son reemplazados por ATP y la ProT $\alpha$ , funcionando así como una proteína quinasa (ProT $\alpha$ K).

La nueva capacidad de la isoforma M2 aquí demostrada debe ser añadida a las otras funciones biológicas principales descritas para esta proteína: actividad PK en células proliferantes con una elevada demanda energética [Eigenbrodt *et al.*, 1992], proteína de unión a la hormona tiroidea 3,3',5-triiodo-L-tironina (T<sub>3</sub>) en su forma monomérica [Kato *et al.*, 1989; Ashizawa *et al.*, 1991], y proteína de unión a factores de transcripción (HIF-1, HIF-2, Oct-4) en el núcleo celular, promoviendo la transactivación y expresión génica [Luo *et al.*, 2011; Luo & Semenza, 2011; Yang *et al.*, 2011].

De acuerdo con los resultados de esta tesis, la nueva habilidad descrita de la isoenzima M2 para fosforilar a la ProT $\alpha$  en linfocitos en proliferación está presente solo en una pequeña proporción del contenido celular total de la proteína M2. Además, la adquisición de la actividad ProT $\alpha$ K por esta fracción de la isoforma M2 parece ser debida a un proceso de fosforilación en residuos de serina y treonina que, además de ser esencial para su actividad catalítica, induce una asociación trimérica de la ProT $\alpha$ K (Resultados 3.1 y 3.2).

De esta forma, los resultados de nuestro laboratorio demuestran que la fosforilación de la isoenzima M2 es la responsable de conferir actividad ProT $\alpha$ K a aproximadamente un 10% del contenido celular total de la proteína M2. Esta proporción se ajusta a los



niveles de la proteína M2 fosforilada que se han encontrado en células en proliferación [Eingenbrodt *et al.*, 1992]; y se encuentra también en concordancia con la cantidad de la ProTα que es fosforilada en linfocitos proliferantes (18% del total celular) [Pérez-Estévez *et al.*, 1997].

Conforme a las propiedades de la ProTαK aquí descritas y a aquellas que han sido demostradas anteriormente [Pérez-Estévez *et al.*, 1997, 2000], es probable que la actividad ProTαK de la proteína M2 pueda ocurrir en cualquier célula de mamífero en proliferación. Sin embargo, la especificidad de la M2-ProTαK podría diferir dependiendo del origen celular de esta enzima. Así, la ProTαK procedente de linfocitos murinos normales fosforila a la ProTα no sólo en el residuo de treonina 7 de su secuencia sino también en residuos de treonina en posición 12 o 13 [Pérez-Estévez *et al.*, 1997], mientras que la ProTαK de células tumorales fosforila a la ProTα únicamente en treonina 7 (presentes resultados; *Resultados 4.2* y figura 4 del *Anexo*).

La proteína M2 es la isoforma predominante de la PK en células proliferantes [Clower *et al.*, 2010; David *et al.*, 2010; Muñoz & Ponce, 2003; Eingenbrodt *et al.*, 1992]; sin embargo, dependiendo de las diferentes funciones metabólicas de los tejidos, otras isoenzimas de la PK son expresadas mostrando diferencias en sus características cinéticas y en sus mecanismos de regulación. Así, la isoenzima tipo L de la PK (L-PK) es expresada en tejidos gluconeogénicos como el hígado, riñón e intestino [Brinck *et al.*, 1994; Domingo *et al.*, 1992; Steinberg *et al.*, 1999]; la isoenzima tipo R (R-PK) se expresa en los eritrocitos [Rodríguez-Horche *et al.*, 1987]; y la isoenzima tipo M1 (M1-PK) es característica de los tejidos con elevadas necesidades energéticas, como el músculo y el cerebro [Carbonell *et al.*, 1973; Reinacher *et al.*, 1979; Yamada & Noguchi, 1999b].

La fosforilación de algunas de las isoenzimas de la PK ha sido ampliamente descrita [revisado en Mazurek, 2011]. En el caso de la isoforma L hepática se ha demostrado que dicha fosforilación controla la actividad PK en este tejido [El-Maghrabi *et al.*, 1980; Moule & McGivan, 1991]: la L-PK es fosforilada por una proteína quinasa dependiente de cAMP y regulada por el glucagón [Yamada & Noguchi, 1999a], y dicha fosforilación provoca su inactivación en condiciones fisiológicas.



La isoenzima M1 de la PK no está regulada alostéricamente ni es fosforilada; un dato consecuente con los resultados obtenidos en esta tesis en los que no se detecta actividad ProTαK para esta isoforma (*Resultados 2.5*). Además, esta incapacidad de la isoforma M1 para fosforilar a la ProTα está en concordancia con el hecho de que la concentración de la ProTα en el músculo de mamíferos es inapreciable [Clinton *et al.*, 1989].

En el caso de la isoforma M2, su fosforilación ha sido descrita previamente, aunque la significación biológica de esta fosforilación permanece controvertida [Eingenbrodt *et al.*, 1992; revisado en Mazurek, 2011]. La proteína M2 parece ser el sustrato de proteína quinasas que, en células normales, fosforilan a la isoforma M2 sólo en residuos de serina y treonina [Oude Weernink *et al.*, 1990; Mazurek *et al.*, 2007, Le Mellay *et al.*, 2002]; mientras que en células tumorales es fosforilada también en residuos de tirosina [Presek *et al.*, 1988; Hitosugi *et al.*, 2009].

Sin embargo, las características de la fosforilación de la proteína M2 encontrada por nosotros en células NC37 difieren de las observadas previamente. Así, no encontramos ningún residuo fosforilado de tirosina en la isoforma M2 procedente de linfocitos tumorales en nuestro estudio (*Resultados 3.1*). Por otra parte, demostramos que esta fosforilación tiene una clara transcendencia biológica, la de propiciar un extraordinario cambio catalítico en la isoenzima M2, que le confiere la función de proteína quinasa capaz de fosforilar a la ProTα. Esta modificación resulta en importantes diferencias en el comportamiento de la proteína M2 y afecta a su afinidad a sustratos y cosustratos y a su respuesta a efectores típicos de la PK (*Resultados 2.6*).

La estructura trimérica mostrada por la M2-ProTαK complementa las otras dos estructuras cuaternarias que se han descrito para la proteína M2, tetramero y dímero, que, a su vez, difieren en su actividad y propiedades cinéticas [Eingenbrodt & Glossmann, 1980; Eingenbrodt *et al.*, 1992; Mazurek, 2007, 2011; Shimada *et al.*, 2008; Yamada & Noguchi, 1999a, b; Zwerschke *et al.*, 1999]. La forma tetramérica posee una elevada afinidad por su sustrato PEP, mientras que la afinidad de la forma dimérica por este sustrato es muy baja [Eingenbrodt & Glossmann, 1980; Eingenbrodt *et al.*, 1992; Mazurek *et al.*, 2005; Mazurek, 2007]. Esto significa que a concentraciones fisiológicas

de PEP únicamente la forma tetramérica de la M2-PK estaría activa, y la forma dimérica se encontraría en un estado cercano a la inactividad [Mazurek & Eigenbrodt, 2003; Eigenbrodt *et al.*, 1992, 1998]. De esta manera, el contenido celular de asociaciones tetraméricas y diméricas contribuye a regular la actividad PK de la isoenzima M2.

Las concentraciones de las conformaciones tetrámerica y dimérica pueden oscilar dependiendo de la presencia de ciertos intermediarios metabólicos, de la interacción con oncoproteínas como HPV-16 E7 [Mazurek *et al.*, 2001, 2005, 2007; revisado en Mazurek, 2011] y de modificaciones provocadas por procesos de fosforilación [Hitosugi *et al.*, 2009]. Un importante metabolito regulador de la estructura cuaternaria de la M2-PK es la fructosa 1,6-bisfosfato (FBP) [Ashizawa *et al.*, 1991; Muñoz & Ponce, 2003; Dombrauckas *et al.*, 2005]: a elevadas concentraciones, la FBP interacciona con la forma dimérica promoviendo su tetramerización y activación, mientras que la liberación de este intermediario glucolítico de la enzima causa su disociación en el dímero inactivo. La disociación de la M2 es un proceso reversible en células en división, y el dímero reensamblado como tetrámero recupera su actividad enzimática de nuevo para la producción de energía (ATP).

La FBP también parece tener influencia en la actividad ProTαK, induciendo un aparente cambio en la estructura cuaternaria de la M2-ProTαK; sin embargo, su efecto en la actividad fosforilante sobre la ProTα es muy ligero, por lo que parece improbable que esta molécula regule a la ProTαK *in vivo*, como hace con la actividad PK.

Además, el aminoácido L-alanina disminuye alostéricamente la afinidad de la M2-PK por el PEP y son necesarias concentraciones más elevadas de FBP para inducir su tetramerización [Eigenbrodt *et al.*, 1992]; un proceso similar de inhibición de la actividad PK es provocado por la L-cisteína [Eigenbrodt *et al.*, 1992; revisado en Mazurek, 2011]. Sin embargo, estos aminoácidos no parecen modificar la actividad de la ProTαK; como tampoco lo hace la hormona tiroidea 3,3',5-triiodo-L-tironina (T<sub>3</sub>), cuya capacidad para interactuar con el monómero de la M2-PK, estabilizándolo y previniendo su asociación tetramérica, ha sido demostrada [Kato *et al.*, 1989] (Resultados 2.6).

En este sentido, no puede descartarse que otros efectores, afectando a la fosforilación de la proteína M2 o a su asociación cuaternaria, pudieran ser reguladores *in vivo* de la actividad ProTαK.

En lo concerniente a la proteína quinasa que podría ser responsable de la fosforilación de la proteína M2 que induce su actividad ProTαK, no parece corresponderse con ninguna de las hasta ahora descritas. Así, se han detallado dos proteínas quinasas, la quinasa A-Raf [Le Mellay *et al.*, 2002; Mazurek *et al.*, 2007] y la δPKC [Siwko *et al.*, 2007], con la capacidad de fosforilar *in vivo* en residuos de serina a la isoforma M2 de la PK en células en proliferación.

Sin embargo, la fosforilación por la isoenzima A-Raf, una quinasa activada en mitosis celular, relacionada con la proliferación celular y la diferenciación, y que se expresa en tejidos en división [Naumann *et al.*, 1997; Leicht *et al.*, 2007], induce la dimerización (inactivación) o tetramerización (activación) de la M2-PK dependiendo de las condiciones y rutas metabólicas secundarias, características que no coinciden con las que encontramos para la M2-ProTαK.

La función biológica de la interacción de la isoforma M2 con la δPKC no está todavía clara. Se ha sugerido que la fosforilación de M2 por la δPKC podría ser un paso para regular su estabilidad y degradación proteolítica [Siwko *et al.*, 2007]. Además, esta fosforilación no altera la actividad PK de la proteína M2, por lo que esta enzima no parece ser una candidata para promover su actividad ProTαK.

Recientemente se ha identificado que el receptor FGFR1 de fibroblastos posee actividad quinasa y fosforila a la M2-PK en el residuo de tirosina 105, provocando su inhibición por la liberación de la FBP y la ruptura de la forma tetramérica [Hitosugi *et al.*, 2009]. La quinasa pp60v-src también fosforila en residuos de tirosina a varias proteínas celulares incluyendo a la M2-PK [Cooper *et al.*, 1983, Eigenbrodt *et al.*, 1998; Presek *et al.*, 1980, 1988], e induce el desplazamiento de la forma tetramérica a la forma dimérica de esta isoenzima, anula su afinidad por el PEP y reduce su actividad PK [Eigenbrodt *et al.*, 1998; Presek *et al.*, 1980, 1988], aunque ésta puede ser restaurada

mediante la incubación con FBP. Otras proteína quinasas que interaccionan con la M2-PK y la fosforilan en residuos de tirosina promoviendo su inactivación han sido descritas: la quinasa JAK-2 [Hitosugi *et al.*, 2009], el receptor IgE [Oak *et al.*, 1999; Ryu *et al.*, 2008] y la proteína E7 del virus tipo 16 del papiloma humano, que provoca la separación de la proteína M2 en forma dimérica fosforilada del complejo glucolítico [Mazurek *et al.*, 2001; Presek *et al.*, 1988; Eingenbrodt *et al.*, 1998; Zwerschke *et al.*, 1999].

De acuerdo con estos datos, las propiedades inducidas por la fosforilación de la proteína M2 mediada por estas enzimas no se corresponden con las encontradas en esta tesis para la M2-ProTαK. Por lo tanto, parece probable que otra proteína quinasa sea responsable de la inducción de la actividad M2-ProTαK. En este sentido, hemos de indicar que en experimentos previos realizados en nuestro laboratorio [Pérez-Estévez *et al.*, 2000] se encontró que la promoción de la actividad ProTαK en esplenocitos de ratón activados para proliferar es un proceso dependiente de la PKC, aunque la PKC no fosforila directamente a la ProTα.

La habilidad recientemente encontrada de la proteína M2 para unirse a péptidos de fosfo-tirosina [Cristofk *et al.*, 2008; Hitosugi *et al.*, 2009;], que modulan su conformación alostérica provocando la liberación de la FBP y la consiguiente inhibición de su actividad PK, evidencia la disponibilidad de esta proteína para ser el sustrato de proteína quinasas activadas mediante fosforilación en residuos de tirosina.

Permanece, por tanto, como un reto futuro la caracterización de la enzima implicada en la fosforilación de la isoforma M2 y en la promoción de su actividad M2-ProTαK, así como la identificación de los lugares de fosforilación en la secuencia de M2, que contribuirá a clarificar el mecanismo de este proceso. En este sentido, en la realización de esta tesis no se consiguió reproducir la actividad ProTαK *in vitro*, usando extractos citosólicos de células NC37 (como fuente de la proteína quinasa específica) y proteína M2 purificada de esas células como sustrato (previamente tratada con fosfatasa).

Debe recordarse que en nuestro laboratorio se ha encontrado una enzima, la CK-2, que es capaz de fosforilar a la ProTα *in vitro* [Barcia *et al.*, 1992]. De hecho, los lugares de fosforilación de la ProTα se corresponden con motivos CK-2; sin embargo, los sitios de

fosforilación de la ProTα por la CK-2, así como las diferentes propiedades de la ProTαK respecto a la CK-2 (estructura, masa molecular y composición de subunidades; incapacidad para fosforilar a los sustratos de la CK-2, no supresión por anticuerpos anti-CK-2 e imposibilidad de usar GTP como donador de fosfato), descartan la posibilidad de que, *in vivo*, la CK-2 se corresponda con la ProTαK, al menos en linfocitos [Barcia *et al.*, 1992].

Una cuestión de particular interés es la razón de por qué la actividad ProTαK es mostrada por la proteína M2. De acuerdo con las funciones biológicas atribuidas a la ProTα y la proteína M2 hasta el momento, varios argumentos pueden plantearse para explicar la relación entre estas dos proteínas. Uno podría ser la coincidencia de la expresión de la proteína M2 [Noguchi *et al.*, 1986; Clower *et al.*, 2010; David *et al.*, 2010] y el aumento de la actividad ProTαK con la actividad proliferativa de las células [Pérez-Estévez *et al.*, 1997]. En este sentido, la estimulación mitogénica de timocitos de rata con concanavalina A e interleuquina-2 demuestra un incremento del mRNA de la M2-PK y de la cantidad de proteína de la isoenzima M2 durante la fase S del ciclo celular [Netzker *et al.*, 1992]; y concuerda con los niveles más elevados de la actividad ProTαK en esta fase del ciclo celular, que comienzan a declinar cuando la células entran en la fase G<sub>2</sub> [Pérez-Estévez *et al.*, 2000].

Otro aspecto que incide en la relación funcional de las proteínas M2 y la ProTα es el relativo a las actividades nucleares descritas para estas proteínas. De este modo, se ha demostrado la capacidad de la isoforma M2 de migrar al núcleo y se han descrito diferentes mecanismos de translocación basados en la existencia de una señal inducible de localización nuclear en su extremo C-terminal y en la interacción con otras proteínas que provocan modificaciones en su estructura [Hoshino *et al.*, 2007; Spoden *et al.*, 2009; Schneider *et al.*, 2002]. Así, la ligasa SUMO-E3 (inhibidor de STAT3) induce la sumoilación de la proteína M2 y su transporte al núcleo de la célula, donde participaría en la regulación de la transcripción génica [Lee *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2011; Luo & Semenza, 2011; Yang *et al.*, 2011].

Así, recientemente, se ha identificado que la proteína M2 puede actuar en el núcleo celular como coactivador del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1), aumentando su actividad transcripcional [Luo *et al.*, 2011; Luo & Semenza, 2011]. Estos datos sugieren que la hidroxilación de la proteína M2 dependiente de la hidroxilasa PHD3 permite a M2 unirse a la subunidad  $\alpha$  de HIF-1 y al coactivador p300, promoviendo y estabilizando la unión de HIF-1 en regiones promotoras (elementos de respuesta a hipoxia: HRE) de genes relacionados con el metabolismo glucolítico. p300 cataliza la acetilación de los residuos de lisina del extremo N-terminal de las histonas del octámero e induce cambios en la estructura de la cromatina que promueven la transcripción génica dependiente de HIF-1 [Arany *et al.*, 1996].

Por otra parte, HIF-1 no parece ser la única proteína nuclear regulada por la isoforma M2, la cual es capaz también de unirse al factor HIF-2 y potenciar su transactivación [Luo *et al.*, 2011]. Además, en el compartimento nuclear, se ha demostrado que la isoforma M2 participa en la interacción con la histona H1 [Ignacak & Starchurska, 2003] y en la modulación del factor de transcripción 4 de unión al octámero (Oct-4), implicado en el mantenimiento del estado pluripotencial de las células embrionarias y en la prevención de la expresión de genes asociados con la diferenciación [Lee *et al.*, 2008]. Asimismo, ha sido descrita en el núcleo la interacción de la proteína M2 con la  $\beta$ -catenina fosforilada, y la unión del complejo resultante a la región promotora del gen CCND1: esta asociación en su conformación activa facilita la liberación de la deacetilasa de histonas HDAC3 del promotor, provocando un incremento en la acetilación de la histona H3 y la activación de la expresión de la ciclina D1 [Yang *et al.*, 2011].

La actividad nuclear de la proteína M2 guarda una importante similitud con la función descrita hasta ahora para la ProT $\alpha$ . Así, está bien documentada la migración y actividad nuclear de la ProT $\alpha$  [Conteas *et al.*, 1990; Enkemann *et al.*, 2000a; Vareli *et al.*, 2000] y su relación funcional con la actividad de la cromatina mediante mecanismos que implican su interacción con H1 y las histonas del octámero [Freire *et al.*, 2001; Díaz-Jullien *et al.*, 1996; Covelo *et al.*, 2006; Papamarcaki *et al.*, 1994; Karetsoy *et al.*, 1998; Gómez-Márquez *et al.*, 1988; Gómez-Márquez, 2007; George & Brown, 2010; Zakharova *et al.*, 2011], con enzimas modificadores de histonas (acetilasas de H3 y H4

y metilasa de H3) [Covelo *et al.*, 2006] que incluyen a la acetiltransferasa p300 [Cotter & Robertson., 2000], y con diversos factores de transcripción como CBP, SET y STAT3 [Karetsou *et al.*, 2002, 2004; Yang *et al.*, 2004].

Otro argumento, más especulativo, que apoya la correlación funcional de la proteína M2 con la ProTα pudiera derivarse de un efecto común antiapoptótico de la isoenzima M2 y la ProTα en células en proliferación. Así, el control del flujo glucolítico ejercido por la isoforma M2 en las células en proliferación que catabolizan glucosa a lactato incluso en presencia de oxígeno (*efecto Warburg*) [Warburg *et al.*, 1924], induce una disminución en la fosforilación oxidativa y en los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del citocromo c [Eingenbrodt *et al.*, 1992], y podría promover un efecto antiapoptótico que puede estar relacionado con el descrito para la ProTα [Jiang *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2010]. En este sentido, se ha demostrado que la estimulación de la transcripción del gen PKM de la proteína M2 mediada por la interacción del factor SP1 con el complejo CBP/p300 es inhibida por especies reactivas del oxígeno [Yamada & Noguchi, 1999b; Schäfer *et al.*, 1996].

De esta manera, la participación común de la ProTα y de la isoforma M2 en la proliferación celular podría también promover otra función esencial que permite progresar el ciclo celular: evitar la apoptosis.

Una importante cuestión por resolver es el significado biológico que tiene la fosforilación de la ProTα. Aunque en nuestro laboratorio se ha encontrado que la fosforilación de esta proteína no afecta a su interacción con las histonas y otras proteínas nucleares [Covelo *et al.*, 2006; Freire *et al.*, 2001], hasta ahora no se había demostrado la trascendencia biológica de este proceso.

Los resultados aquí presentados aportan más información sobre el posible sentido biológico de la fosforilación de la ProTα, enmarcándose en el efecto de este proceso sobre la distribución subcelular de la ProTα y sobre su actividad antiapoptótica.

En este sentido, nuestros experimentos de transfección en células HeLa usando la ProTα recombinante mutada en su lugar de fosforilación treonina 7 (T7A) indican que dicha fosforilación no tiene influencia en su transporte al núcleo celular (*Resultados 5.1*).

No obstante, los resultados de esta tesis sí relacionan la fosforilación de la ProTα con su actividad anti-apoptótica: así, la sobreexpresión de la ProTα recombinante no mutada en células 293T en las que se ha estimulado la apoptosis provoca una disminución de la actividad de la caspasa 9 y caspasa 3 inducidas por el apoptosoma; pero este efecto inhibitorio no es observado al sobreexpresar la ProTα incapaz de ser fosforilada (mutada en el residuo de treonina 7), lo que parece indicar la dependencia de la actividad antiapoptótica de la ProTα sobre la formación del apoptosoma con su fosforilación en treonina 7 mediada por la ProTαK (*Resultados 5.2*).

Estos resultados se relacionan con los datos previos que señalan las propiedades antiapoptóticas de la sobreexpresión de la ProTα en diferentes tipos celulares, cuyo mecanismo de actuación se vincula con la inhibición de la formación del apoptosoma y la regulación de la activación de la caspasa 9 y la caspasa 3 [Jiang *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2010, revisado en Letsas & Frangou-Lazaridis, 2006]. El mecanismo antiapoptótico de la ProTα parece producirse como resultado de su unión a Apaf-1 para prevenir el enlace de este factor con el citocromo c y, por lo tanto, la formación del apoptosoma. Bloqueado el apoptosoma, la procaspasa 9 no puede ser activada para inducir la activación de la caspasa 3 y la consiguiente cascada efectora que promueve la muerte celular programada.

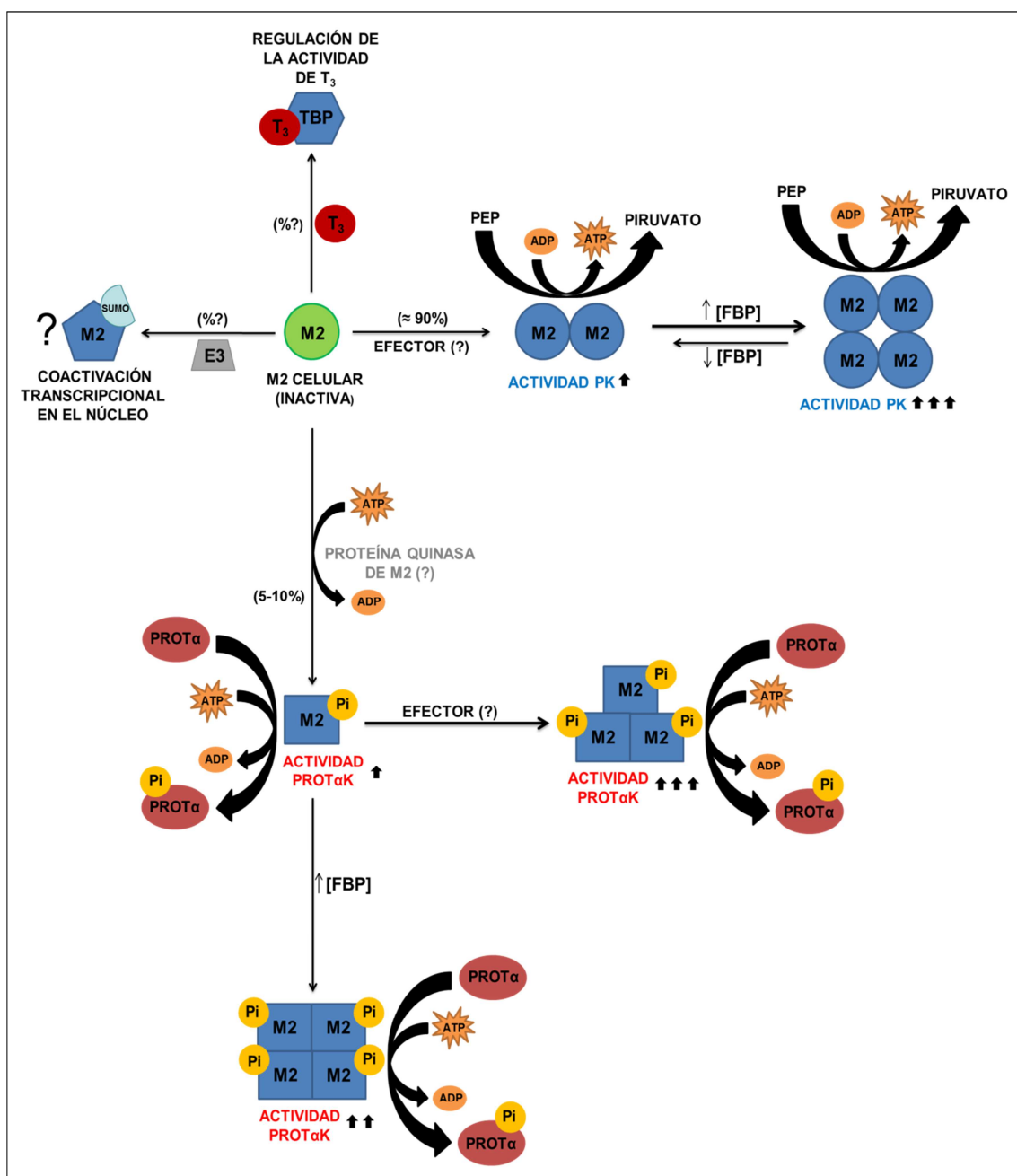
Otros autores han investigado la función de la ProTα en la apoptosis mediante la transfección de un siRNA de la ProTα en diferentes tipos celulares para bloquear la traducción de su mRNA [Wu *et al.*, 2011]. Así, han demostrado que el *silenciamiento* del gen de la ProTα acelera el proceso apoptótico después del tratamiento celular con inductores de la apoptosis como la actinomicina D o el etopósido.

Además, recientemente, se ha observado que la sobreexpresión de la ProTα inhibe la activación de la caspasa 3 y suprime la ruta de muerte celular programada en células neuronales y no neuronales [Dong *et al.*, 2012], reforzando los resultados presentados en estas tesis.



Finalmente, la importancia del proceso de fosforilación de la ProT $\alpha$  en otros eventos nucleares o citoplasmáticos (como su actividad remodeladora de la cromatina [Díaz-Jullien *et al.*, 1996; Covelo *et al.*, 2006; Gómez-Márquez & Rodríguez, 1998] o su asociación con otros factores implicados en la proliferación y supervivencia celular [revisado en Letsas & Frangou-Lazaridis, 2006]) no debe ser descartada y merece más investigaciones futuras.

Además de profundizar en el conocimiento de los mecanismos responsables de la actividad biológica de la ProT $\alpha$ , la experimentación incluida en esta Tesis Doctoral ha permitido establecer una novedosa función bioquímica para la isoforma M2, que ha de añadirse a las actividades descritas hasta ahora para esta proteína y que se resumen en el esquema 1. En él se representa la evolución celular de la proteína M2, de acuerdo con lo aportado en nuestra investigación y en otras realizadas en los últimos años. Como se indica en dicho esquema, quedan por esclarecer las características de actuación y regulación de diversos efectores y mecanismos participantes en la biología de la isoforma M2 y de la propia ProT $\alpha$ , que la investigación futura seguro resolverá.



Esquema 1. Efecto de diversos metabolitos y mecanismos reguladores en la estructura cuaternaria y actividades biológicas descritas para la proteína M2.

Cabe resaltar, por último, que la actividad bifuncional de la proteína M2 demostrada en nuestra investigación, detallada en esta Tesis Doctoral y ya publicada por nuestro laboratorio [Díaz-Jullien *et al.*, 2011] ha sido confirmada recientemente por otros autores [Gao *et al.*, 2012]: sus resultados corroboran que la isoforma M2 puede actuar como una proteína quinasa, en este caso fosforilando directamente a la proteína STAT3. Así, será de especial interés en el futuro identificar otros sustratos de la isoforma M2 y descubrir la función celular de la fosforilación de estas proteínas.

## **CONCLUSIONES**



## VI. CONCLUSIONES

De la actividad investigadora aquí presentada podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. La proteína quinasa que fosforila a la ProT $\alpha$  (ProT $\alpha$ K) purificada de linfocitos tumorales humanos (células NC37) y analizada mediante espectrometría de masas se corresponde con la proteína M2 expresada por el gen PKM de la piruvato quinasa (PK) (EC. 2.7.1.40).
2. Nuestro estudio de la proteína M2 en células NC37 demostró una novedosa bifuncionalidad enzimática para esta proteína: actividad PK/actividad ProT $\alpha$ K; aunque solo un 10% del contenido celular total de la proteína M2 posee capacidad de fosforilación sobre la ProT $\alpha$ . Además, esta fracción se diferencia del resto de la M2 celular (que mantiene la actividad PK) por su afinidad específica a ProT $\alpha$ -Sepharosa y por su respuesta diferencial a efectores típicos de la M2-PK. Por otra parte, la isoforma M1, expresada por el mismo gen, posee únicamente actividad PK.
3. En la investigación sobre el origen de la observada bifuncionalidad enzimática de la proteína M2, hemos demostrado que la fosforilación en residuos de serina y treonina de un 10% del contenido celular de esta proteína es esencial para generar su afinidad por la ProT $\alpha$  y, además, promover la adquisición de la actividad ProT $\alpha$ K. Esta fosforilación induce una asociación trimérica de la isoforma M2 que conlleva un incremento de su actividad ProT $\alpha$ K. Además, dicha estructura cuaternaria resulta modificada por la fructosa 1,6-bisfosfato (FBP), que provoca una reasociación tetramérica de la proteína M2 fosforilada y una ligera disminución de la actividad fosforilante sobre la ProT $\alpha$ . En contraste, la proteína M2 con actividad PK no es fosforilada en las células NC37 y experimenta una evolución de su estructura cuaternaria, dimérica (menos activa) a tetramérica (activa), inducida por la FBP.

4. En el análisis del comportamiento celular de la proteína M2 y la ProT $\alpha$ , demostramos la interacción *in vivo* de la ProT $\alpha$  con aproximadamente un 10% de la fracción total de la proteína M2 en diferentes tipos celulares (NC37 y 293T). Por otro lado, demostramos también que la actividad de la M2-ProT $\alpha$ K, fosforilando a la ProT $\alpha$  en un residuo de treonina 7 de su secuencia, se manifiesta de forma idéntica *in vitro* e *in vivo*.
  
5. La investigación de la trascendencia que la fosforilación de la ProT $\alpha$  pudiera tener sobre algunos aspectos de su actividad biológica demostró que la fosforilación de esta proteína en treonina 7 no afecta a su proceso de migración al núcleo. Sin embargo, esta fosforilación parece ser fundamental para su función citoplasmática relacionada con la regulación de la apoptosis, puesto que las células que sobreexpresan la ProT $\alpha$  no fosforilada presentan una menor capacidad de prevención de la apoptosis, tal como se demuestra por el incremento de las actividades de la caspasa 9 y la caspasa 3 tras la inducción apoptótica de estas células.

**ANEXO**





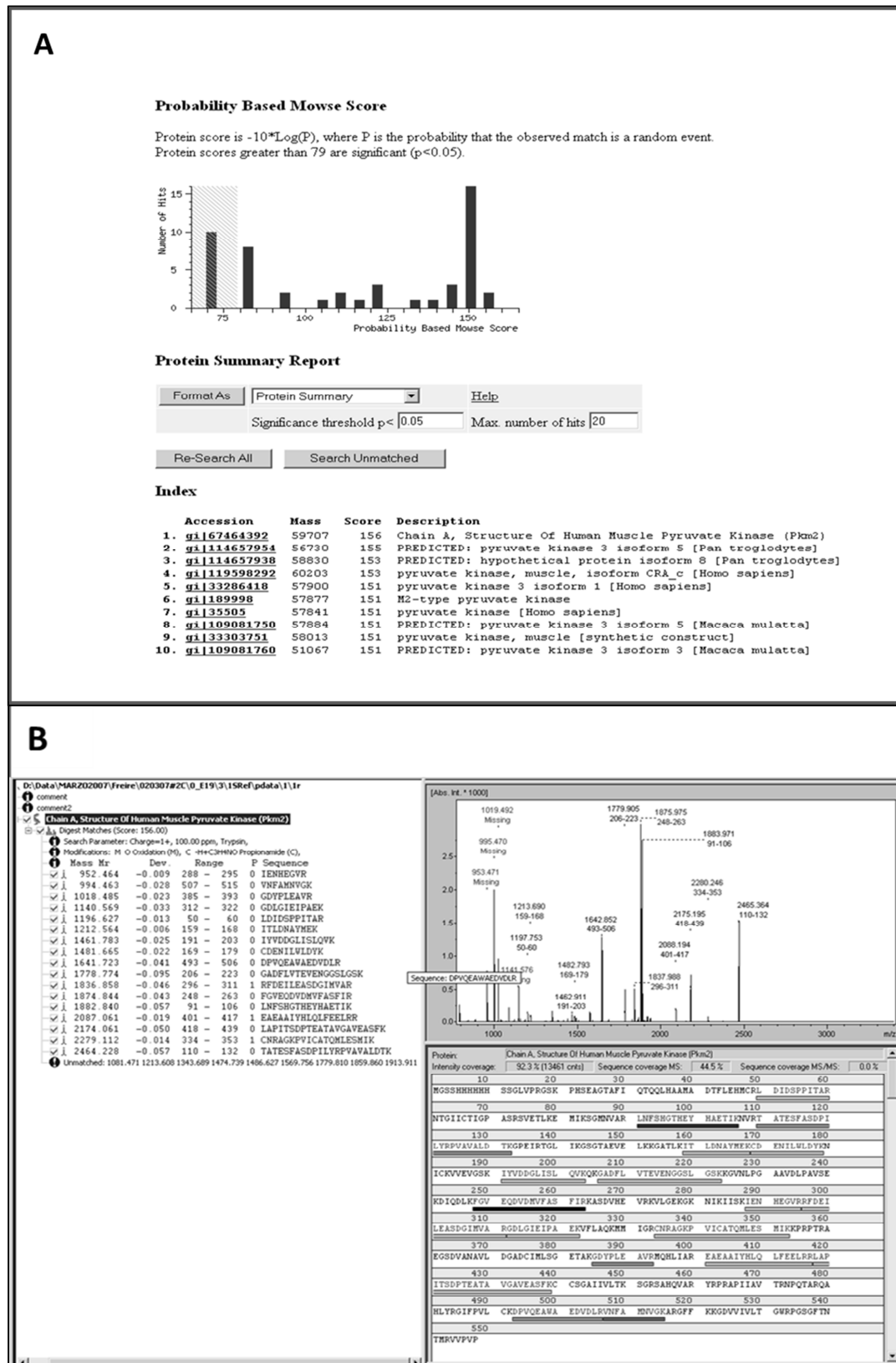


Figura 1. Espectro de masas MALDI-TOF de la mezcla de péptidos obtenidos en la digestión de la banda de 60 kDa del gel con actividad ProTaK (purificada del citosol de células NC37 como se describe en la figura 1 de *Resultados* y en *Material y Métodos* 3.4).

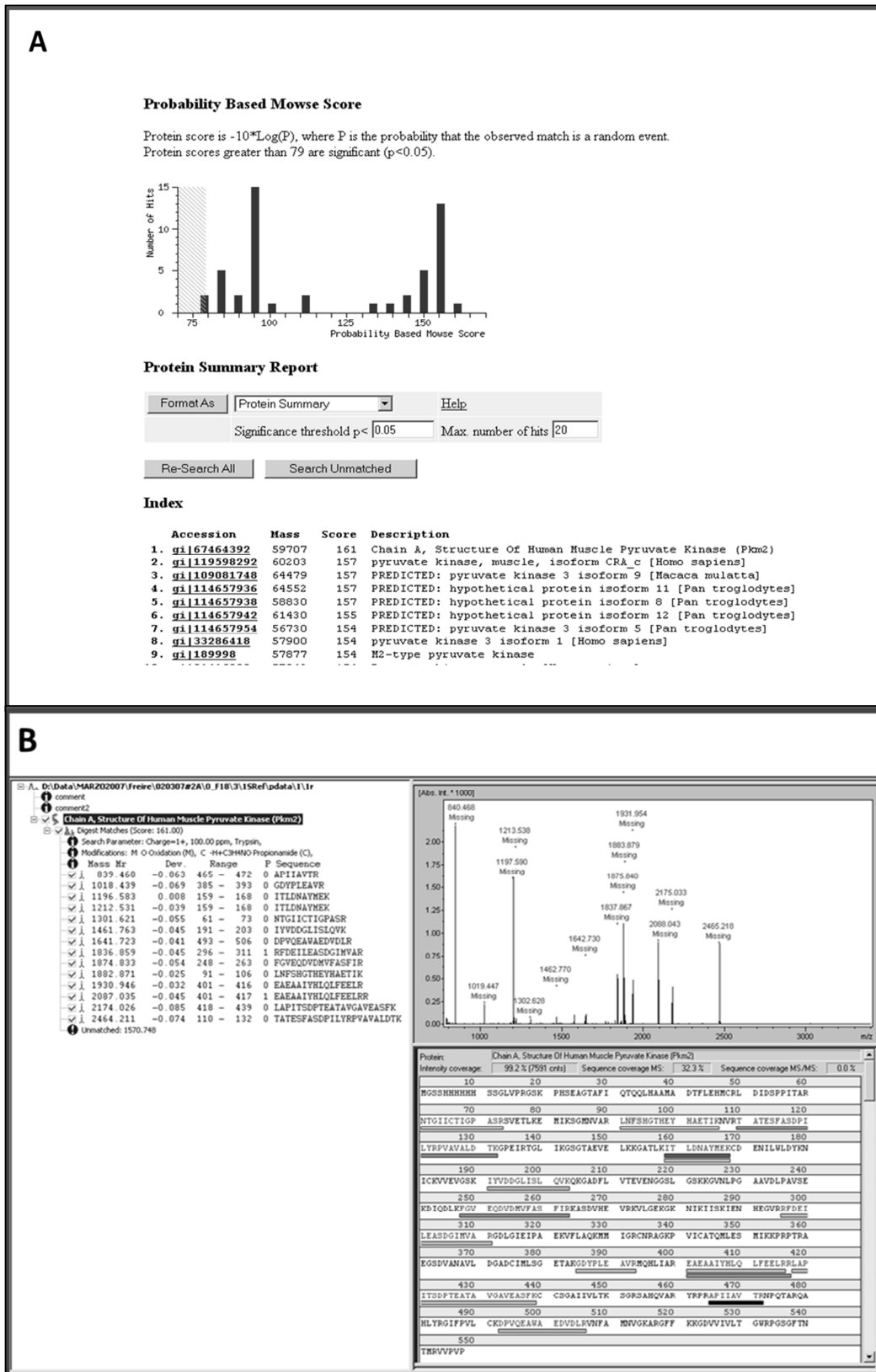
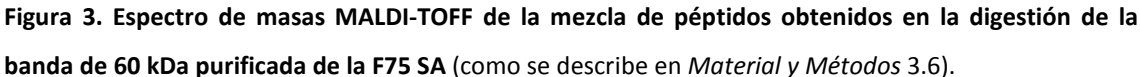
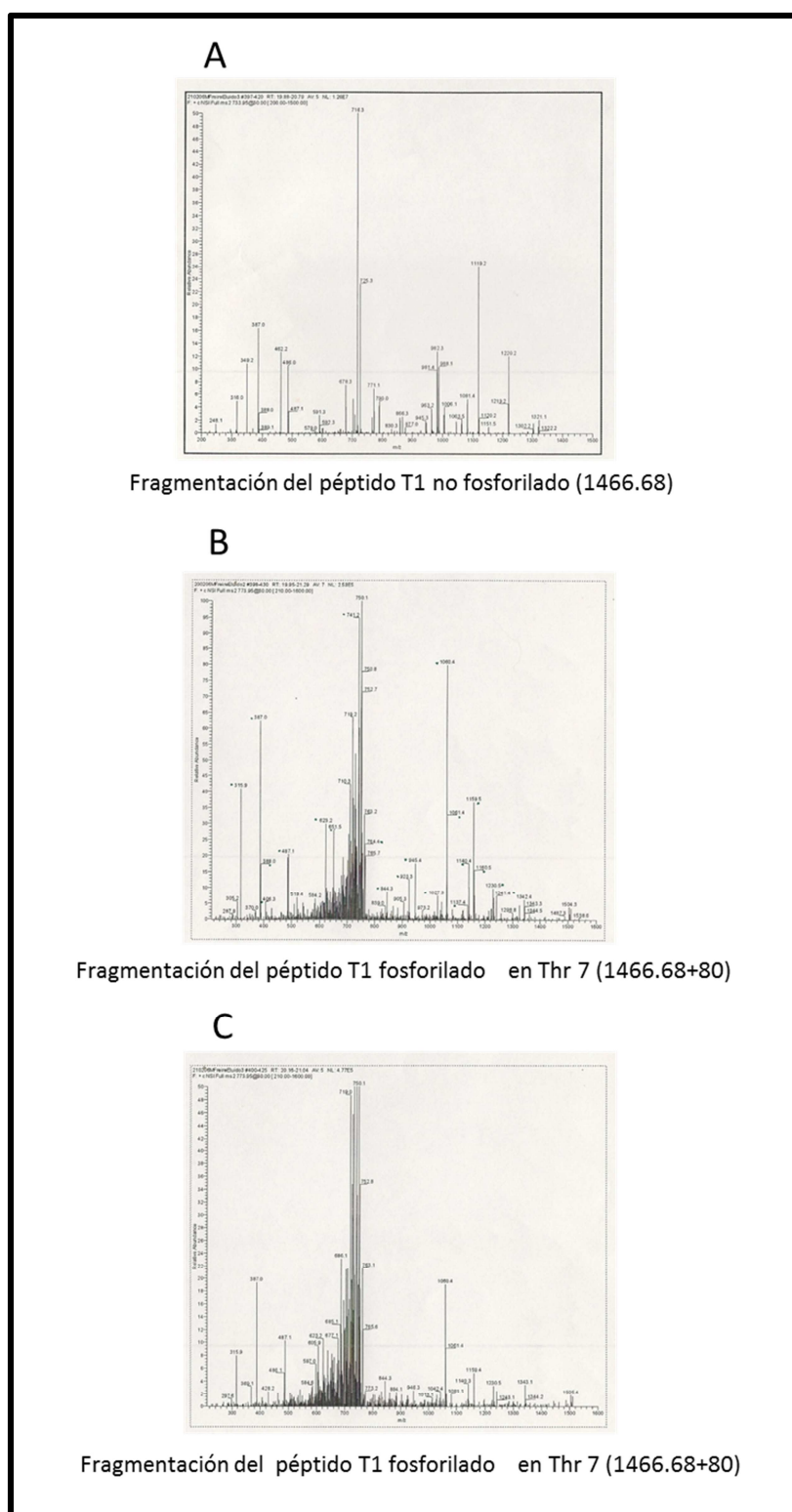


Figura 2. Espectro de masas MALDI-TOFF de la mezcla de péptidos obtenidos en la digestión de la banda de 60 kDa purificada de la F45 SA (como se describe en *Material y Métodos* 3.6).





**Figura 4. Identificación de los lugares de fosforilación de la ProTα.** El espectro MS/MS del péptido tríptico T1 (aminoácidos 1-14 de la secuencia de la ProTα) **A)** derivado de la ProTα desfosforilada *in vitro* y separado por HPLC de fase reversa (masa molecular de 1466.68 Da), **B)** de la ProTα nativa purificada de células NC37 (masa molecular de 1466.68 + 80 Da) y **C)** de la ProTα fosforilada *in vitro* por la M2-ProTαK (masa molecular de 1466.68 + 80 Da) **(C)** fue obtenido como se describe en *Material y Métodos* (apartado 3.5), mediante análisis *Linear Ion Traps-MS* (LIT) usando el modo *Simple Ion Reaction* (SIR).

## **BIBLIOGRAFÍA**



## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X. y Akey, C. W. 2002. *Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation*. Mol. Cell. 9(2):423-432.
- Adams, J. M. y Cory, S. 1998. *The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival*. Science. 281(5381): 1322-1326.
- Álvarez, C. V., Zalvide, J. B., Cancio, E., Diéguez, C., Regueiro, B. J., Vega, F. V. y Domínguez, F. 1993. *Regulation of prothymosin  $\alpha$  mRNA levels in rat pituitary tumor cells*. Neuroendocrinology. 57(6): 1048-1056.
- Aniello, F., Branno, M., De Rienzo, G., Ferrara, D., Palmiero, C. y Minucci, S. 2002. *First evidence of prothymosin  $\alpha$  in a non-mammalian vertebrate and its involvement in the spermatogenesis of the frog *Rana esculenta**. Mech. Dev. 110(1-2): 213-217.
- Arany, Z., Huang, L. E., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M. A., Bunn, H. F. y Livingston, D. M. 1996. *An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93(23): 12969-12973.
- Ashizawa, K., McPhie, P., Lin, K. H. y Cheng, S. Y. 1991. *An in vitro novel mechanism of regulating the activity of pyruvate kinase M2 by thyroid hormone and fructose 1, 6-bisphosphate*. Biochemistry. 30(29): 7105-7111.
- Ashizawa, K. y Cheng, S. Y. 1992. *Regulation of thyroid hormone receptor-mediated transcription by a cytosol protein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89(19): 9277-9281.
- Bamburg, J. R. y Bernstein, B. 1991. *Actin and actin-binding proteins in neurons*. In *The Neuronal Cytoskeleton*. R. Burgoyne (Eds). 121-160. Wiley-Liss. New York .
- Bannister, A. J. & Kouzarides, T. 1996. *The CBP co-activator is a histone acetyltransferase*. Nature. 384(6610): 641-643.
- Barcia, M. G., Castro, J. M., Díaz-Jullien, C., González, C. G. y Freire, M. 1992. *Prothymosin  $\alpha$  is phosphorylated by casein kinase-2*. FEBS Lett. 312(2-3): 152-156.
- Barcia, M. G., Castro, J. M., Díaz-Jullien, C. y Freire, M. 1993. *Prothymosin  $\alpha$  is phosphorylated in proliferating stimulated cells*. J. Biol. Chem. 268(7): 4704-4708.
- Battle, T. E. y Frank, D. A. *The role of STATs in apoptosis*. Curr. Mol. Med. 2(4): 381-392.
- Ben-Yosef, T., Yanuka, O., Halle, D. y Benvenisty, N. 1998. *Involvement of Myc targets in c-myc and N-myc induced human tumors*. Oncogene 17(2): 165-171.

- Bloom, D. A. y Jaiswal, A. K.** 2003. *Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression.* J. Biol. Chem. 278(45): 44675-44682.
- Boán, F., Viñas, A., Buceta, M., Domínguez, F., Sánchez, L. y Gómez-Márquez, J.** 2001. *Prothymosin  $\alpha$ , a mammalian c-myc-regulated acidic nuclear protein, provokes the decondensation of human chromosomes in vitro.* Cytogenet. Cell Genet. 93(3-4): 171-174.
- Boulton, T. G., Zhong, Z., Wen, Z., Darnell, J. E. Jr., Stahl, N. y Yancopoulos, G. D.** 1995. *STAT3 activation by cytokines utilizing gp130 and related transducers involves a secondary modification requiring an H7-sensitive kinase.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92(15): 6915-6919.
- Bradford, M. M.** 1976. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Brand, I. A. y Heinickel, A.** 1991. *Key enzymes of carbohydrate metabolism as targets of the 11.5-kDa  $Zn^{+2}$ -binding protein (parathymosin).* J. Biol. Chem. 266(31): 20984-20989.
- Brand, I. A., Heinickel, A. y Söling, H. D.** 1991. *Localization of a 11.5 kDa  $Zn^{+2}$ -binding protein (parathymosin) in different rat tissues. Cell type-specific distribution between cytosolic and nuclear compartment.* Eur. J. Cell. Biol. 54(1): 157-165.
- Brennan, C. M., Gallouzi, I. E. y Steitz, J. A.** 2000. *Protein ligands to HuR modulate its interaction with target mRNAs in vivo.* J. Cell. Biol. 151(1): 1-14.
- Brennan, C. M. y Steitz, J. A.** 2001. *HuR and mRNA stability.* Cell. Mol. Life Sci. 58(2): 266-77.
- Brinck, U., Eigenbrodt, E., Oehmke, M., Mazurek, S. y Fischer, G.** 1994. *L- and M2-pyruvate kinase expression in renal cell carcinomas and their metastases.* Virchows Arch. 424(2): 177-185.
- Bromberg, J. F., Wrzeszczynska, M. H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R. G., Albanese, C. y Darnell, J. E. Jr.** 1999. *Stat3 as an oncogene.* Cell. 98(3): 295-303.
- Bromberg, J. y Darnell, J. E. Jr.** 2000. *The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function.* Oncogene. 19(21): 2468-2473.
- Bücher, T. y Pfeleiderer, C.** 1955. *Methods in Enzymology. Piruvate kinase from muscle.* Vol. 1. 435-440.



- Bui, N. T., Livolsi, A., Peyron, J. F. y Prehn, J. H.** 2001. *Activation of nuclear factor  $\kappa B$  and Bcl-x survival gene expression by nerve growth factor requires tyrosine phosphorylation of I $\kappa B\alpha$ .* J. Cell. Biol. 152(4): 753-764.
- Bustelo, X. R., Otero, A., Gómez-Márquez, J. y Freire, M.** 1991. *Expression of the rat prothymosin alpha gene during T-lymphocyte proliferation and liver regeneration.* J. Biol. Chem. 266(3): 1443-1447.
- Caldarella, J., Goodall, G. J., Felix, A. M., Heimer, E. P., Salvin, S. B. y Horecker, B. L.** 1983. *Thymosin  $\alpha_{11}$ : A peptide related to thymosin  $\alpha_1$  isolated from calf thymosin fraction 5.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80(24): 7424-7427.
- Campbell, G. S., Meyer, D. J., Raz, R., Levy, D. E., Schwartz, J. y Carter-Su, C.** 1995. *Activation of acute phase response factor (APRF)/Stat3 transcription factor by growth hormone.* J. Biol. Chem. 270(8): 3974-3979.
- Carbonell, J., Felíu, J. E., Marco, R. y Sols, A.** 1973. *Pyruvate kinase. Classes of regulatory isoenzymes in mammalian tissues.* Eur. J. Biochem. 37(1): 148-156.
- Cardoso, M. C., Leonhardt, H. y Nadal-Ginard, B.** 1993. *Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: cyclin A and cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication.* Cell. 74(6): 979-992.
- Carpintero, P., Anadón, R., del Amo, F., y Gómez-Márquez, J.** 1995. *The thymosin  $\beta_4$  gene is strongly activated in neural tissues during early postimplantation mouse development.* Neurosci. Lett. 184(1): 63-66.
- Chang, J. H. y Olson, M. O.** 1989. *A single gene codes for two forms of rat nucleolar protein B23 mRNA.* J. Biol. Chem. 264(20): 11732-11737.
- Chao, D. T. y Korsmeyer, S. J.** 1998. *BCL-2 family: regulators of cell death.* Annu. Rev. Immunol. 16: 395-419.
- Chen, J. M., Dando, P. M., Rawlings, N. D., Brown, M. A., Young, N. E., Stevens, R. A., Hewittm E., Watts, C. y Barrett, A. J.** 1997. *Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase.* J. Biol. Chem. 272(12): 8090-8098.
- Chen, T. H., Brody, J. R., Romantsev, F. E., Yu, J. G., Kayler, A. E., Voneiff, E., Kuhajda, F. P. y Pasternack, G. R.** 1996. *Structure of pp32, an acidic nuclear protein which inhibits oncogene-induced formation of transformed foci.* Mol. Biol. Cell. 7(12): 2045-56.

- Chen, W., Sun, Z., Wang, X. J., Jiang, T., Huang, Z., Fang, D. y Zhang, D. D.** 2009. *Direct interaction between Nrf2 and p21(Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response.* Mol. Cell. 34(6): 663-673.
- Christofk, H. R., Vander Heiden, M. G., Wu, N., Asara, J. M. y Cantley, L. C.** 2008. *Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein.* Nature. 452(7184): 181-186.
- Cino, E. A., Wong-ekkabut, J., Karttunen, M. y Choy, W. Y.** 2011. *Microsecond molecular dynamics simulations of intrinsically disordered proteins involved in the oxidative stress response.* PLoS One. 6(11): e27371.
- Clinton, M., Frangou-Lazaridis, M., Panneerselvam, C. y Horecker, B. L.** 1989. *Prothymosin  $\alpha$  and parathymosin: mRNA and polypeptide levels in rodent tissues.* Arch. Biochem. Biophys. 269(1): 256-263.
- Clinton, M., Graeve, L., el-Dorry, H., Rodríguez-Boulán, E. y Horecker, B. L.** 1991. *Evidence for nuclear targeting of prothymosin and parathymosin synthesized in situ.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88(15): 6608-6612.
- Clower, C. V., Chatterjee, D., Wang, Z., Cantley, L. C., Vander, Heiden, M. G. y Krainer, A. R.** 2010. *The alternative splicing repressors hnRNP A1/A2 and PTB influence pyruvate kinase isoform expression and cell metabolism.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107(5): 1894-1899.
- Conteas, C. N., Mutchnick, M. G., Palmer, K. C., Weller, F.E., Luk, G. D., Naylor, P. H., Erdos, M. R., Goldstein, A. L., Panneerselvam, C. y Horecker, B. L.** 1990. *Cellular levels of thymosin immunoreactive peptides are linked to proliferative events: evidence for a nuclear site of action.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87(9): 3269-3273.
- Cooper, J. A., Reiss, N. A., Schwartz, R. J. y Hunter, T.** 1983. *Three glycolytic enzymes are phosphorylated at tyrosine in cells transformed by Rous sarcoma virus.* Nature. 302(5905): 218-223.
- Cotter, M. A. y Robertson, E. S.** 2000. *Modulation of histone acetyltransferase activity through interaction of Epstein-Barr nuclear antigen 3C with prothymosin  $\alpha$ .* Mol. Cell Biol. 20(15): 5722-5735.
- Covelo, G., Sarandeses, C. S., Díaz-Jullien, C. y Freire, M.** *Prothymosin  $\alpha$  interacts with free core histones in the nucleus of dividing cells.* J. Biochem. 140: 627-637.
- Crocker, S. J., Lamba, W. R., Smith, P. D., Callaghan, S. M., Slack, R. S., Anisman, H. y Park, D. S.** 2001. *c-Jun mediates axotomy-induced dopamine neuron death in vivo.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98(23): 13385-13390.

**Cullinan, S. B. y Diehl, J. A.** 2006. *Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway*. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 38(3): 317-332.

**Dalakas, M., Engel, W. K., McClure, J. E. y Goldstein, A. L.** 1981. *Immunocytochemical localization of thymosin  $\alpha_1$  in thymic epithelial cells of normal and myasthenia gravis patients and thymic cultures*. J. Neurol. Sci. 50(2): 239-247.

**Dando, P. M., Fortunato, M., Smith, L., Knight, C. G., McKendrick, J. E. y Barrett, A. J.** 1999. *Pig kidney legumain: an asparaginyl endopeptidase with restricted specificity*. Biochem. J. 339 (Pt 3): 743-749.

**David, C. J., Chen, M., Assanah, M., Canoll, P. y Manley, J. L.** 2010. *HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer*. Nature. 463(7279): 364-368.

**Desbarats, L., Schneider, A., Müller, D., Bürgin, A. y Eilers, M.** 1996. *Myc: a single gene controls both proliferation and apoptosis in mammalian cells*. Experientia. 52(12): 1123-1129.

**Deveraux, Q. L. y Reed, J. C.** 1999. *IAP family proteins-suppressors of apoptosis*. Genes Dev. 13(3): 239-252.

**Díaz-Jullien, C., Pérez-Estévez, A., Covelo, G. y Freire, M.** 1996. *Prothymosin  $\alpha$  binds histones in vitro and shows activity in nucleosome assembly assay*. Biochim. Biophys. Acta. 1296(2): 219-227.

**Díaz-Jullien, C., Moreira, D., Sarandeses, C. S., Covelo, G., Barbeito, P. y Freire, M.** 2011. *The M2-type isoenzyme of pyruvate kinase phosphorylates prothymosin  $\alpha$  in proliferating lymphocytes*. Biochim. Biophys. Acta. 1814(2): 355-365.

**Dingwall, C., Dilworth, S.M., Black, S.J., Kearsey, S.E., Cox, L.S. y Laskey, R.A.** 1987. *Nucleoplasmin cDNA sequence reveals polyglutamic acid tracts and a cluster of sequences homologous to putative nuclear localization signals*. EMBO J. 6(1): 69-74.

**Domashenko, A. D., Latham, K. E. y Hatton, K. S.** 1997. *Expression of myc-family, myc-interacting, and myc-target genes during preimplantation mouse development*. Mol. Reprod. Dev. 47(1): 57-65.

**Dombrauckas, J. D., Santarsiero, B. D. y Mesecar, A. D.** 2005. *Structural basis for tumor pyruvate kinase M2 allosteric regulation and catalysis*. Biochemistry. 44(27): 9417-9429.

- Domingo, M., Einig, C., Eigenbrodt, E. y Reinacher, M.** 1992. *Immunohistological demonstration of pyruvate kinase isoenzyme type L in rat with monoclonal antibodies*. J. Histochem. Cytochem. 40(5): 665-673.
- Domínguez, F., Magdalena, C., Cancio, E., Rosón, E., Paredes, J., Loidi, L., Zalvide, J., Fraga, M., Forteza, J. y Regueiro, B. J.** 1993. *Tissue concentrations of prothymosin  $\alpha$ : a novel proliferation index of primary breast cancer*. Eur. J. Cancer. 29A(6): 893-897.
- Dong, G., Callegari, E. A., Gloeckner, C. J., Ueffing, M. y Wang, H.** 2012. *Prothymosin  $\alpha$  interacts with mutant huntingtin and suppresses its cytotoxicity in cell culture*. J. Biol. Chem. 287(2): 1279-1289.
- Dosil, M., Freire, M. y Gómez-Márquez, J.** 1990. *Tissue-specific and differential expression of prothymosin  $\alpha$  gene during rat development*. FEBS Lett. 269(2): 373-376.
- Dosil, M., Álvarez-Fernández, L. y Gómez-Márquez, J.** 1993. *Differentiation-linked expression of prothymosin  $\alpha$  gene in human myeloid leukemic cells*. Exp. Cell Res. 204(1): 94-101.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. y Wang, X.** 2000. *Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition*. Cell. 102(1): 33-42.
- Earnshaw, W. C.** 1987. *Anionic regions in nuclear proteins*. J. Cell Biol. 105(4): 1479-1482.
- Economou, M., Seferiadis, K., Frangou-Lazaridis, M., Horecker, B. L. y Tsolas, O.** 1988. *Isolation and partial characterization of prothymosin  $\alpha$  from porcine tissues*. FEBS Lett. 233(2): 342-346.
- Eigenbrodt, E. y Glossmann, H.** 1980. *Glycolysis-one of the keys to cancer?*. Trends Pharmacol. Sci. 1: 240-245.
- Eigenbrodt, E., Reinacher, M., Scheefers-Borchel, U., Scheefers, H. y Friis, R.** 1992. *Double role for pyruvate kinase type M2 in the expansion of phosphometabolite pools found in tumor cells*. Crit. Rev. Oncog. 3(1-2): 91-115.
- Eigenbrodt, E., Mazurek, S. y Friis, R.** 1998. In: Bannasch, P., Kanduc, D., Papam S., Tager, J.M. (eds). *Double role of pyruvate kinase type M2 in the regulation of phosphometabolite pools*. Cell Growth and Oncogenesis. Basel: Birkhäuser Verlag. 15-30.

Eilers, M., Schirm, S. y Bishop, J. M. 1991. *The MYC protein activates transcription of the  $\alpha$ -prothymosin gene*. EMBO J. 10(1): 133-141.

El-Maghrabi, M. R., Haston, W. S., Flockhart, D. A., Claus, T. H. y Pilakis, S. J. 1980. *Studies on the phosphorylation and dephosphorylation of L-type pyruvate kinase by the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase*. J. Biol. Chem. 255(2): 668-675.

Encinar, J. A., Mallo, G. V., Mizyrycki, C., Giono, L., Gonzalez-Ros, J. M., Rico, M., Cánepa, E., Moreno, S., Neira, J. L. y Iovanna, J. L. 2001. *Human p8 is a HMG-I/Y-like protein with DNA binding activity enhanced by phosphorylation*. J. Biol. Chem. 276(4): 2742-2751.

Enkemann, S. A., Pavur, K. S., Ryazanov, A. G. y Berger, S. L. 1999. *Does prothymosin  $\alpha$  affect the phosphorylation of elongation factor 2?* J. Biol. Chem. 274(26): 18644-18650.

Enkemann, S. A., Ward, R. D. y Berger, S. L. 2000a. *Mobility within the nucleus and neighboring cytosol is a key feature of prothymosin  $\alpha$* . J. Histochem. Cytochem. 48(10): 1341-1355.

Enkemann, S. A., Wang, R. H., Trumbore, M. W. y Berger, S. L. 2000b. *Functional discontinuities in prothymosin  $\alpha$  caused by caspase cleavage in apoptotic cells*. J. Cell. Physiol. 182(2): 256-268.

Eschenfeldt, W. H. y Berger, S. L. 1986. *The human prothymosin  $\alpha$  gene is polymorphic and induced upon growth stimulation: evidence using a cloned cDNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83(24): 9403-9407.

Eschenfeldt, W. H., Manrow, R. E., Krug, M. S. y Berger, S. L. 1989. *Isolation and partial sequencing of the human prothymosin  $\alpha$  gene family. Evidence against export of the gene products*. J. Biol. Chem. 264(13): 7546-7555.

Erickson-Vitanen, S., Ruggieri, S., Natalini, P. y Horecker, B. L. 1982. *Distribution of thymosin  $\beta_4$  in vertebrate classes*. Arch. Biochem. Biophys. 221(3): 570-576.

Evstafieva, A. G., Belov, G. A., Kalkum, M., Chichkova, N. V., Bogdanov, A. A., Agol, V. I. y Vartapetian, A. B. 2000. *Prothymosin  $\alpha$  fragmentation in apoptosis*. FEBS Lett. 467(2-3): 150-154.

Evstafieva, A. G., Belov, G. A., Rubtsov, Y. P., Kalkum, M., Joseph, B., Chichkova, N. V., Sukhacheva, E. A., Bogdanov, A. A., Pettersson, R. F., Agol, V. I. y Vartapetian, A. B. 2003. *Apoptosis-related fragmentation, translocation, and properties of human prothymosin  $\alpha$* . Exp. Cell Res. 284(2): 211-223

- Fan, Z., Beresford, P. J., Oh, D. Y., Zhang, D. y Lieberman, J.** 2003. *Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor.* Cell. 112(5): 659-672.
- Fang, F. y Newport, J. W.** 1991. *Evidence that the G1-S and G2-M transitions are controlled by different cdc2 proteins in higher eukaryotes.* Cell 66(4): 731-742.
- Franco, F. J., Díaz, C., Barcia, M., Arias, P., Gómez-Márquez, J., Soriano, F., Méndez, E. y Freire, M.** 1989. *Synthesis and apparent secretion of prothymosin  $\alpha$  by different subpopulations of calf and rat thymocytes.* Immunology 67(2): 263-268.
- Franco, F. J., Díaz, C., Barcia, M. y Freire, M.** 1992. *Thymosin  $\alpha_1$  is a native peptide in several tissues.* Biochim. Biophys. Acta. 1120(1): 43-48.
- Franco del Amo, F. y Freire, M.** 1995. *The prothymosin  $\alpha$  gene is specifically expressed in ectodermal and mesodermal regions during early postimplantation mouse embryogenesis.* FEBS Lett. 359(1): 15-19.
- Frangou-Lazaridis, M., Clinton, M., Goodall, G. J. y Horecker, B. L.** 1988. *Prothymosin  $\alpha$  and parathymosin: amino acid sequences deduced from the cloned rat spleen cDNAs.* Arch. Biochem. Biophys. 263(2): 305-310.
- Freire, J., Covelo, G., Sarandeses, C., Díaz-Jullien, C. y Freire, M.** 2001. *Identification of nuclear-import and cell-cycle regulatory proteins that bind to prothymosin  $\alpha$ .* Biochem. Cell Biol. 79(2): 123-131.
- Freire, M., Crivellaro, O., Isaacs, C., Moschera, S. y Horecker, B. L.** 1978. *Translation of mRNA from calf thymus in the wheat germ system: Evidence for a precursor of thymosin  $\alpha_1$ .* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75(12): 6007-6011.
- Freire, M., Hannappel, E., Rey, M., Freire, J. M., Kibo, H. K. y Horecker, B. L.** 1981. *Purification of thymus mRNA coding for a 16.000 dalton polypeptide containing the thymosin  $\alpha_1$  sequence.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78(1): 192-195.
- Freire, M., Rey-Méndez, M., Gómez-Márquez, J. y Arias, P.** 1985. *Evidence for the synthesis of thymosin  $\alpha_1$  by calf thymocytes and for the production of this peptide by natural processing.* Arch. Biochem. Biophys. 239(2): 480-485.
- Freire, M., Díaz-Jullien, C. y Covelo, G.** 2002. In Recent. Res. Devel. Proteins. *Developments in prothymosin  $\alpha$  research.* Transworld Res. Netw. Kerala. 1: 257-276.
- Frillingos, S., Frangou-Lazaridis, M., Seferiadis, K., Hulmes, J. D., Pan, Y. C. y Tsolas, O.** 1991. *Isolation and partial sequence of goat spleen prothymosin  $\alpha$ .* Mol. Cell. Biochem. 108(1): 85-94.

Gao, X., Wang, H., Yang, J. J., Liu, X. y Liu, Z. R. 2012. *Pyruvate kinase M2 regulates gene transcription by acting as a protein kinase*. Mol. Cell.

Gast, K., Damaschun, H., Eckert, K., Schulze-Forster, K., Maurer, H. R., Muller-Frohne, M., Zirwer, D., Czarnecki, J. y Damaschun, G. 1995. *Prothymosin  $\alpha$ : a biologically active protein with random coil conformation*. Biochemistry 34(40): 13211-13218.

Gaubatz, S., Meichle, A. y Eilers, M. 1994. *An E-box element localized in the first intron mediates regulation of the prothymosin  $\alpha$  gene by c-myc*. Mol. Cell. Biol. 14(6): 3853-3862.

Genini, D., Budihardjo, I., Plunkett, W., Wang, X., Carrera, C. J., Cottam, H. B., Carson, D. A. y Leoni, L. M. 2000. *Nucleotide requirements for the in vitro activation of the apoptosis protein-activating factor-1-mediated caspase pathway*. J. Biol. Chem. 275(1): 29-34.

George, E. M. y Brown, D. T. 2010. *Prothymosin  $\alpha$  is a component of a linker histone chaperone*. FEBS Lett. 584(13): 2833-2836.

Ghayur, T., Banerjee, S., Hugunin, M., Butler, D., Herzog, L., Carter, A., Quintal, L., Sekut, L., Talanian, R., Paskind, M., Wong, W., Kamen, R., Tracey, D. y Allen, H. 1997. *Caspase-1 processes IFN- $\gamma$ -inducing factor and regulates LPS-induced IFN- $\gamma$  production*. Nature. 386(6625): 619-623.

Goldstein, A. L., Slater, F. D. y White, A. 1966. *Preparation, assay and partial purification of a thymic lymphocytopietic factor (Thymosin)*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 56(3): 1010-1017.

Goldstein, A. L., Guha, A., Zatz, M., Hardy, M. A. y White, A. 1972. *Purification and biological activity of thymosin, a hormone of the thymus gland*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69(7): 1800-1803.

Goldstein, A. L., Low, T. L. K., McAdoo, M., McClure, J., Thurman, G. B., Rossio, J., Lai, C-Y., Chang, D., Wang, S-S., Harvey, C., Ramel, A. H. y Meienhofer, J. 1977. *Thymosin  $\alpha_1$ : Isolation and sequence analysis of an immunologically active thymic polypeptide*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74(2): 725-729.

Goldstein, A. L., Hannappel, E. y Kleinman, H. K. 2005. *Thymosin  $\beta_4$ : actin-sequestering protein moonlights to repair injured tissues*. Trends Mol. Med. 2005 11(9): 421-429.

Goldstein, J. C., Waterhouse, N. J., Juin, P., Evan, G. I. y Green, D. R. 2000. *The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant*. Nat. Cell. Biol. 2(3): 156-162.

- Gómez-Márquez, J. y Segade, F.** 1988. *Prothymosin  $\alpha$  is a nuclear protein*. FEBS Lett. 226(2): 217-219.
- Gómez-Márquez, J., Dosil, M., Segade, F., Bustelo, X. R., Pichel, J. G., Dominguez, F. y Freire, M.** 1989a. *Thymosin  $\beta_4$  gene. Preliminary characterization and expression in tissues, thymic cells and lymphocytes*. J. Immunol. 143(8): 2740-2744.
- Gómez-Márquez, J., Segade, F., Dosil, M., Pichel, J. G., Bustelo, X. R. y Freire, M.** 1989b. *The expression of prothymosin  $\alpha$  gene in T lymphocytes and leukemic lymphoid cells is tied to lymphocyte proliferation*. J. Biol. Chem. 264(15): 8451-8454.
- Gómez-Márquez, J., Franco del Amo, F., Carpintero, P. y Anadón, R.** 1996. *High levels of mouse thymosin  $\beta_4$  mRNA in differentiating P19 embryonic cells and during development of cardiovascular tissues*. Biochem. Biophys. Acta. 1306: 187-193.
- Gómez-Márquez, J. & Rodríguez, P.** 1998. *Prothymosin  $\alpha$  is a chromatin-remodelling protein in mammalian cells*. Biochem. J. 333(1): 1-3.
- Gómez-Márquez, J. y Anadón, R.** 2002. *The beta-thymosins, small actin-binding peptides widely expressed in the developing and adult cerebellum*. Cerebellum 1: 95-102.
- Gómez-Márquez, J.** 2007. *Function of prothymosin  $\alpha$  in chromatin decondensation and expression of thymosin  $\beta_4$  linked to angiogenesis and synaptic plasticity*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1112: 201-219.
- Goodall, G. J., Domínguez, F. y Horecker, B. L.** 1986. *Molecular cloning of cDNA for human prothymosin  $\alpha$* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83(23): 8926-8928.
- Gordon, J. S., Bruno, J. y Lucas, J. J.** 1981. *Heterogeneous binding of high mobility group chromosomal proteins to nuclei*. J. Cell. Biol. 88(2): 373-379.
- Gorospe, M.** 2003. *HuR in the mammalian genotoxic response: post-transcriptional multitasking*. Cell Cycle. 2(5): 412-414.
- Hall, A. K., Hempstead, J. y Morgan, J. I.** 1990. *Thymosin  $\beta_{10}$  levels in developing human brain and its regulation by retinoic acid in the HTB-10 neuroblastoma*. Mol. Brain Res. 8(2): 129-135.
- Hancock, R., Bertrand, H. C., Tsujita, T., Naz, S., El-Bakry, A., Laoruchupong, J., Hayes, J. D. y Wells, G.** 2012. *Peptide inhibitors of the Keap1-Nrf2 protein-protein interaction*. Free Radic. Biol. Med. 52(2): 444-451.
- Hannappel, E., Xu, G-J., Morgan, J., Hempstead, J. y Horecker, B. L.** 1982a. *Thymosin  $\beta_4$ : A ubiquitous peptide in rat and mouse tissues*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79(7): 2172-2175.



- Hannappel, E., Davoust, S. y Horecker, B. L.** 1982b. Thymosins  $\beta_8$  and  $\beta_9$ : *Two peptides isolated from calf thymus homologous to thymosin  $\beta_4$* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79(6): 1708-1711.
- Hannappel, E., Davoust, S. y Horecker, B. L.** 1982c. *Isolation of peptides from calf thymus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 104(1): 266-271.
- Hapke, S., Kessler, H., Lubert, B., Bengel, A., Hutzler, P., Höfler, H., Schmitt, M. y Reuning, U.** 2003. *Ovarian cancer cell proliferation and motility is induced by engagement of integrin  $\alpha(v)\beta_3$ /Vitronectin interaction*. Biol. Chem. 384(7): 1073-83.
- Hara-Nishimura, I., Takeuchi, Y. y Nishimura, M.** 1993. *Molecular characterization of a vacuolar processing enzyme related to a putative cysteine proteinase of Schistosoma mansoni*. Plant Cell. 5(11): 1651-1659.
- Haritos, A. A., Goodall, G. J. y Horecker, B. L.** 1984a. *Prothymosin  $\alpha$ : isolation and properties of the major immunoreactive form of thymosin  $\alpha_1$  in rat thymus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81(4): 1008-1011.
- Haritos, A. A., Tsolas, O. y Horecker, B. L.** 1984b. *Distribution of prothymosin  $\alpha$  in rat tissues*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81(5): 1391-1393.
- Haritos, A. A., Blacher, R., Stein, S., Caldarella, J. y Horecker, B. L.** 1985a. *Primary structure of rat thymus prothymosin  $\alpha$* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82(2): 343-346.
- Haritos, A. A., Caldarella, J. y Horecker, B. L.** 1985b. *Simultaneous isolation and determination of prothymosin  $\alpha$ , parathymosin  $\alpha$ , thymosin  $\beta_4$  and thymosin  $\beta_{10}$* . Anal. Biochem. 144(2): 436-440.
- Haritos, A. A., Salvin, S. B., Blacher, R., Stein, S. y Horecker, B. L.** 1985c. *Parathymosin  $\alpha$ : a peptide from rat tissues with structural homology to prothymosin  $\alpha$* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82(4): 1050-1053.
- Haritos, A. A., Yialouris, P. P., Heimer, E. P., Félix, A. M., Hannappel, E. y Rosemeyer, M. A.** 1989. *Evidence for the monomeric nature of thymosins*. FEBS Lett. 244(2): 287-290.
- Harlow, E. y Lane, D.** 1988. *Antibodies: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hayes, J. D. y McMahon, M.** 2001. *Molecular basis for the contribution of the antioxidant responsive element to cancer chemoprevention*. Cancer Lett. 174(2): 103-113.

- Hegde, R., Srinivasula, S. M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A. S., Fernandes-Alnemri, T. y Alnemri, E. S. 2002. *Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction*. J. Biol. Chem. 277(1): 432-438.
- Hengartner, M. O. 2000. *The biochemistry of apoptosis*. Nature. 407(6805): 770-776.
- Hill, C. S., Packman, L. C. y Thomas, J. O. 1990. *Phosphorylation at clustered -Ser-Pro-X-Lys/Arg- motifs in sperm-specific histones H1 and H2B*. EMBO J. 9(3): 805-813.
- Hitosugi, T., Kang, S., Vander Heiden, M. G., Chung, T. W., Elf, S., Lythgoe, K., Dong, S., Lonial, S., Wang, X., Chen, G. Z., Xie, J., Gu, T. L., Polakiewicz, R. D., Roesel, J.L., Boggon, T.J., Khuri, F.R., Gilliland, D.G., Cantley, L. C., Kaufman, J. y Chen, J. 2009. *Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the Warburg effect and tumor growth*. Sci. Signal. 2(97): ra73.
- Hooper, J. A., McDaniel, M. C., Thurman, G. B., Cohen, G. H., Schulof, R. S. y Goldstein, A. L. 1975. *Purification and properties of bovine thymosin*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 249: 125-144.
- Horn, P. J. y Peterson, C. L. 2002. *Molecular biology. Chromatin higher order folding-wrapping up transcription*. Science. 297(5588): 1824-1827.
- Hoshino, A., Hirst, J. A. y Fujii, H. 2007. *Regulation of cell proliferation by interleukin-3-induced nuclear translocation of pyruvate kinase*. J. Biol. Chem. 282(24): 17706-17711.
- Huang, H. C., Nguyen, T. y Pickett, C. B. 2002. *Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription*. J. Biol. Chem. 277(45): 42769-42774.
- Huff, T., Müller, C. S. G., Otto, A. M., Netzker, R. y Hannapel, E. 2001.  *$\beta$ -Thymosins, small acidic peptides with multiple functions*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 33(3): 205-220.
- Huff, T., Zerkawy, D. y Hannappel, E. 1995. *Interactions of  $\beta$ -thymosins, thymosin  $\beta_4$ -sulfoxide, and N-terminally truncated thymosin  $\beta_4$  with actin studied by equilibrium centrifugation, chemical cross-linking and viscometry*. Eur. J. Biochem. 230 (2): 650-657.
- Huff, T. y Hannappel, E. 1997. *Oxidation and reduction of thymosin  $\beta_4$  and its influence on the interaction with G-actin studied by reverse-phase HPLC and postcolumn derivatization with fluorescamine*. Anal. Chim. Acta. 352: 249-255.
- Hutchcroft, J. E., Anostarios, M. Jr., Harrison, M. L. y Geahlen, R. L. Methods in Enzymology, in: J.N. Abelson, M.I. Simon (Eds.). *Renaturation and assay of protein kinases after electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels*. Vol. 200. Academic Press. San Diego. 417-423.

- Ignacak, J. y Stachurska, M. B.** 2003. *The dual activity of pyruvate kinase type M2 from chromatin extracts of neoplastic cells*. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 134(3): 425-433.
- Imamura, K. y Tanaka, T.** 1982. Methods in Enzimology, in N.P. Kaplan, N.P. Colowick, W.A. Wood (eds.). *Pyruvate kinase isozymes from rat*. Vol.90. Academic Press. San Diego. 150-164.
- Ishimi, Y., Kojima, M., Yamada, M. y Hanaoka, F.** 1987. *Binding mode of nucleosome-assembly protein (AP-I) and histones*. Eur J Biochem. 162(1): 19-24.
- Ishimi, Y. y Kikuchi, A.** 1991. *Identification and molecular cloning of yeast homolog of nucleosome assembly protein I which facilitates nucleosome assembly in vitro*. J Biol Chem. 266(11): 7025-7029.
- Jans, D. A., Ackermann, M. J., Bischoff, J. R., Beach, D. H. y Peters, R.** 1991. *p34cdc2-mediated phosphorylation at T124 inhibits nuclear import of SV-40 T antigen proteins*. J. Cell. Biol. 115(5): 1203-1212.
- Jiang, X. y Wang, X.** 2000. *Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1*. J. Biol. Chem. 275(40): 31199-203.
- Jiang, X., Kim, H. E., Shu, H., Zhao, Y., Zhang, H., Kofron, J., Donnelly, J., Burns, D., Ng, S. C., Rosenberg, S. y Wang, X.** 2003. *Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin  $\alpha$  in a death regulatory pathway*. Science. 299(5604): 223-226.
- Kang, M. I., Kobayashi, A., Wakabayashi, N., Kim, S. G. y Yamamoto, M.** 2004. *Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101(7): 2046-2051.
- Karapetian, R. N., Evstafieva, A. G., Abaeva, I. S., Chichkova, N. V., Filonov, G. S., Rubtsov, Y. P., Sukhacheva, E. A., Melnikov, S. V., Schneider, U., Wanker, E. E. y Vartapetian, A. B.** 2005. *Nuclear oncoprotein prothymosin  $\alpha$  is a partner of Keap1: implications for expression of oxidative stress-protecting genes*. Mol. Cell. Biol. 25(3): 1089-1099.
- Karetsou, Z., Sandaltzopoulos, R., Frangou-Lazaridis, M., Lai, C. Y., Tsolas, O., Becker, P. B. y Papamarcaki, T.** 1998. *Prothymosin  $\alpha$  modulates the interaction of histone H1 with chromatin*. Nucleic. Acids Res. 26(13): 3111-3118.
- Karetsou, Z., Kretsovali, A., Murphy, C., Tsolas, O. y Papamarcaki, T.** 2002. *Prothymosin  $\alpha$  interacts with the CREB-binding protein and potentiates transcription*. EMBO Rep. 3(4): 361-366.

- Karetsou, Z., Martic, G., Tavoulari, S., Christoforidis, S., Wilm, M., Gruss, C. y Papamarcaki, T. 2004. *Prothymosin  $\alpha$  associates with the oncoprotein SET and is involved in chromatin decondensation*. FEBS Lett. 577(3): 496-500.
- Kashat, L., So, A. K., Masui, O., Wang, X. S., Cao, J., Meng, X., Macmillan, C., Ailles, L. E., Siu, K. W., Ralhan, R. y Walfish, P. G. 2010. *Secretome-based identification and characterization of potential biomarkers in thyroid cancer*. J. Proteome Res. 9(11): 5757-5769.
- Kaspar, J. W., Niture, S. K. y Jaiswal, A. K. 2009. *Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress*. Free Radic. Biol. Med. 47(9): 1304-1309.
- Kato, H., Fukuda, T., Parkison, C., McPhie, P. y Cheng, S. Y. 1989. *Cytosolic thyroid hormone-binding protein is a monomer of pyruvate kinase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86(20): 7861-7865.
- Kaufman, P. D., Kobayashi, R., Kessler, N. y Stillman, B. 1995. *The p150 and p60 subunits of chromatin assembly factor I: a molecular link between newly synthesized histones and DNA replication*. Cell. 81(7): 1105-1114.
- Kaufman, R. J. 2002. *Orchestrating the unfolded protein response in health and disease*. J. Clin. Invest. 110(10): 1389-1398.
- Kelman, Z. 1997. *PCNA: structure, functions and interactions*. Oncogene 14(6): 629-640.
- Kensler, T. W., Wakabayashi, N. y Biswal, S. 2007. *Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 47: 89-116.
- Kinoshita, T., Shirasawa, H., Shino, Y., Moriya, H., Desbarats, L., Eilers, M. y Simizu, B. 1997. *Transactivation of prothymosin  $\alpha$  and c-myc promoters by human papillomavirus type 16 E6 protein*. Virology. 232(1): 53-61.
- Kishimoto, A., Saito, N. y Ogita, K. Methods in enzymology, in: J. N. Abelson, M. I. Simon (Eds.), *Preparation and Use of Isozyme-Specific Anti Protein Kinase C Antibodies*. Vol. 200. Academic Press. San Diego. 447-454.
- Kleinschmidt, J. A. y Franke, W. W. 1982. *Soluble acidic complexes containing histones H3 and H4 in nuclei of Xenopus laevis oocytes*. Cell. 29(3): 799-809.
- Kleinschmidt, J. A., Dingwall, C., Maier, G. y Franke, W. W. 1986. *Molecular characterization of a karyophilic, histone-binding protein: cDNA cloning, amino acid sequence and expression of nuclear protein N1/N2 of Xenopus laevis*. EMBO J. 5(13): 3547-3552.

- Klinkert, M. Q., Felleisen, R., Link, G., Ruppel, A. y Beck, E. 1989. *Primary structures of Sm31/32 diagnostic proteins of Schistosoma mansoni and their identification as proteases*. Mol. Biochem. Parasitol. 33(2): 113-122.
- Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., Green, D. R. y Newmeyer, D. D. 1997. *The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis*. Science. 275(5303): 1132-1136.
- Knies, U. E., Behrendorf, H. A., Mitchell, C. A., Deutsch, U., Risau, W., Drexler, H. C. y Clauss, M. 1998. *Regulation of endothelial monocyte-activating polypeptide II release by apoptosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95(21): 12322-12327.
- Kobayashi, A., Kang, M. I., Watai, Y., Tong, K. I., Shibata, T., Uchida, K. y Yamamoto, M. 2006. *Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1*. Mol. Cell. Biol. 26(1): 221-229.
- Kobayashi, T., Wang, T., Maezawa, M., Kobayashi, M., Ohnishi, S., Hatanaka, K., Hige, S., Shimizu, Y., Kato, M., Asaka, M., Tanaka, J., Imamura, M., Hasegawa, K., Tanaka, Y. y Brachmann, R. K. 2006. *Overexpression of the oncoprotein prothymosin  $\alpha$  triggers a p53 response that involves p53 acetylation*. Cancer Res. 66(6): 3137-44.
- Komiyama, T., Pan, L. X., Haritos, A. A., Wideman, J. W., Pan, Y.C., Chang, M., Rogers, I. y Horecker, B. L. 1986. *The primary structure of rat parathymosin*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83(5): 1242-1245.
- Koutouzov, S., Cabrespines, A., Amoura, Z., Chabre, H., Lotton, C. y Bach, J-F. 1996. *Binding of nucleosomes to a cell surface receptor: redistribution and endocytosis in the presence of lupus antibodies*. Eur. J. Immunol. 26(2): 472-486.
- Krecic, A. M. y Swanson, M. S. 1999. *hnRNP complexes: composition, structure, and function*. Curr. Opin. Cell Biol. (3): 363-371.
- Kretsovali, A., Agalioti, T., Spilianakis, C., Tzortzakaki, E., Merika, M. y Papamatheakis, J. 1998. *Involvement of CREB binding protein in expression of major histocompatibility complex class II genes via interaction with the class II transactivator*. Mol. Cell. Biol. 18 (11): 6777-6783.
- Kubota, S., Adachi, Y., Copeland, T. D. y Oroszlan, S. 1995. *Binding of human prothymosin  $\alpha$  to the leucine-motif/activation domains of HTLV-I Rex and HIV-1 Rev*. Eur. J. Biochem. 233(1): 48-54.
- Kuida, K., Lippke, J. A., Ku, G., Harding, M. W., Livingston, D. J., Su, M. S. y Flavell, R. A. 1995. *Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1  $\beta$  converting enzyme*. Science. 267(5206): 2000-2003.

**Laemmli, U. K.** 1970. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature. 227(5259): 680-685.

**Lal, A., Mazan-Mamczarz, K., Kawai, T., Yang, X., Martindale, J. L., y Gorospe, M.** 2004. *Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs*. EMBO J. 23(15): 3092-3102.

**Lal, A., Kawai, T., Yang, X., Mazan-Mamczarz, K. y Gorospe, M.** 2005. *Antiapoptotic function of RNA-binding protein HuR effected through prothymosin  $\alpha$* . EMBO J. 24(10): 1852-1862.

**Lapeyre, B., Bourbon, H. y Amalric, F.** 1987. *Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: an unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84(6): 1472-1476.

**Lasa, M., Marin, O. y Pinna, L. A.** 1997. *Rat liver Golgi apparatus contains a protein kinase similar to the casein kinase of lactating mammary gland*. Eur. J. Biochem. 243(3): 719-725.

**Laskey, R. A., Honda, B. M., Mills, A. D. y Finch, J. T.** 1978. *Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA*. Nature. 275(5679): 416-20.

**Laskey, R. A. y Earnshaw, W. C.** 1980. *Nucleosome assembly*. Nature. 286(5775): 763-767.

**Lauritzen, E., Masson, M., Rubin, I. y Holm, A.** 1990. *Dot immunobinding and immunoblotting of picogram and nanogram quantities of small peptides on activated nitrocellulose*. J. Immunol. Methods. 131(2): 257-267.

**Le Mellay, V., Houben, R., Troppmair, J., Hagemann, C., Mazurek, S., Frey, U., Beigel, J., Weber, C., Benz, R., Eigenbrodt, E. y Rapp, U. R.** 2002. *Regulation of glycolysis by Raf protein serine/threonine kinases*. Adv. Enzyme Regul. 42: 317-332.

**Lee, J., Kim, H. K., Han, Y. M. y Kim, J.** 2008. *Pyruvate kinase isozyme type M2 (PKM2) interacts and cooperates with Oct-4 in regulating transcription*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 40(5): 1043-1054.

**Leicht, D. T., Balan, V., Kaplun, A., Singh-Gupta, V., Kaplun, L., Dobson, M. y Tzivion, G.** 2007. *Raf kinases: function, regulation and role in human cancer*. Biochim. Biophys. Acta. 1773(8): 1196-212.

**Letsas, K. P., Frangou-Lazaridis, M., Skyras, A., Tsatsoulis, A. y Malamou-Mitsi, V.** 2005. *Transcription factor-mediated proliferation and apoptosis in benign and malignant thyroid lesions*. Pathol. Int. 55(11): 694-702.

- Letsas, K. P. y Frangou-Lazaridis, M.** 2006. *Surfing on prothymosin  $\alpha$  proliferation and anti-apoptotic properties*. Neoplasma. 53(2): 92-96.
- Leys, C. M., Nomura, S., LaFleur, B. J., Ferrone, S., Kaminishi, M., Montgomery, E. y Goldenring, J. R.** 2007. *Expression and prognostic significance of prothymosin  $\alpha$  and ERp57 in human gastric cancer*. Surgery. 141(1): 41-50.
- Liu, X y Wang, X.** 2000. In Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. (ed.) *Methods in Enzymology. Cell-Free Systems for Monitoring Steps in Apoptosis Pathways. In vitro assays for caspase-3 activation and DNA fragmentation*. Academic Press. 322: 177-182.
- Low, T. L. K., Thurman, G. B., McAdoo, M., McClure, J., Rossio, J. L., Naylor, P. H. y Goldstein, A. L.** 1979a. *The chemistry and biology of thymosin. I. Isolation, characterization, and biological activities of thymosin  $\alpha_1$  and polypeptide  $\beta_1$  from calf thymus*. J. Biol. Chem. 254(3): 981-986.
- Low, T. L. K. y Goldstein, A. L.** 1979b. *The chemistry and biology of thymosin. II. Amino acid sequence analysis of thymosin  $\alpha_1$  and polypeptide  $\beta_1$* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 254(3): 987-995.
- Low, T. L. K., Hu, S. K. y Goldstein, A. L.** 1981. *Complete amino acid sequence of bovine thymosin beta 4: a thymic hormone that induces terminal deoxynucleotidyl transferase activity in thymocyte populations*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78(2): 1162-1166.
- Low, T. L. K. y Goldstein, A. L.** 1984. *Thymosins: structure, function and therapeutic applications*. Thymus. 6(1-2): 27-42.
- Low, T. L. K. y Goldstein, A. L.** 1985. *Thymic hormones: An overview*. Meth. Enzymol. 116: 213-291.
- Low, T. L. K., Pan, T. L. y Lin, Y. S.** 1990. *Depression of prothymosin  $\alpha$  production in murine thymus correlates with staphylococcal enterotoxin-B induced immunosuppression*. FEBS Lett. 273(1-2): 1-5.
- Luo, W., Hu, H., Chang, R., Zhong, J., Knabel, M., O'Meally, R., Cole, R. N., Pandey, A. y Semenza, G. L.** 2011. *Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1*. Cell. 145(5): 732-744.
- Luo, W. y Semenza, G. L.** 2011. *Pyruvate kinase M2 regulates glucose metabolism by functioning as a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 in cancer cells*. Oncotarget. 2(7): 551-556.
- Lutz, W., Stohr, M., Schurmann, J., Wenzel, A., Lohr, A. y Schwab, M.** 1996. *Conditional expression of N-myc in human neuroblastoma cells increases expression of  $\alpha$ -prothymosin and ornithine decarboxylase and accelerates progression into S-phase early after mitogenic stimulation of quiescent cells*. Oncogene 13(4): 803-812.

- Manoury, B., Hewitt, E. W., Morrice, N., Dando, P. M., Barrett, A. J. y Watts, C.** 1998. *An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation.* Nature. 396(6712): 695-699.
- McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., Chanas, S. A., Henderson, C. J., McLellan, L. I., Wolf, C. R., Cavin, C. y Hayes, J. D.** 2001. *The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes.* Cancer Res. 61(8): 3299-3307.
- McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M. y Hayes J. D.** 2003. *Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression.* J. Biol. Chem. 278(24): 21592-21600.
- Magdalena, C., Dominguez, F., Loidi, L., y Puente J. L.** 2000. *Tumour prothymosin  $\alpha$  content, a potential prognostic marker for primary breast cancer.* Br. J. Cancer. 82(3): 584-590.
- Malicet, C., Giroux, V., Vasseur, S., Dagorn, J. C., Neira, J. L. y Iovanna, J. L.** 2006. *Regulation of apoptosis by the p8/prothymosin  $\alpha$  complex.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103(8): 2671-2676.
- Malinda, K. M., Goldstein, A. L. y H. K. Kleinman, H. K.** 1997. *Thymosin  $\beta_4$  stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells.* FASEB J. 11: 474-481.
- Manrow, R. E., Sburlati, A. R., Hanover, J. A. y Berger, S. L.** 1991. *Nuclear targeting of prothymosin  $\alpha$ .* J. Biol. Chem. 266(6): 3916-24.
- Manrow, R. E., Leone, A., Krug, M. S., Eschenfeldt, W. H. y Berger, S. L.** 1992. *The human prothymosin  $\alpha$  gene family contains several processed pseudogenes lacking deleterious lesions.* Genomics 13(2): 319-331.
- Manrow, R. E. y Berger, S. L.** 1993. *GAG triplets as splice acceptors of last resort. An unusual form of alternative splicing in prothymosin  $\alpha$  pre-mRNA.* J. Mol. Biol. 234(2): 281-288.
- Markova, O. V., Evstafieva, A. G., Mansurova, S. E., Moussine, S. S., Palamarchuk, L. A., Pereverzev, M. O., Vartapetian, A. B. y Skulachev, V. P.** 2003. *Cytochrome c is transformed from anti- to pro-oxidant when interacting with truncated oncoprotein prothymosin  $\alpha$ .* Biochim. Biophys. Acta. 1557(1-3): 109-117.
- Martínez-Balbas, M. A., Bannister, A. J., Martin, K., Haus-Seuffert, P., Meisterernst, M. y Kouzarides, T.** 1998. *The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription.* EMBO J. 17(10): 2886-2893.



- Martini, P. G, Delage-Mourroux, R., Kraichely, D. M. y Katzenellenbogen, B. S.** 2000. *Prothymosin  $\alpha$  selectively enhances estrogen receptor transcriptional activity by interacting with a repressor of estrogen receptor activity.* Mol. Cell. Biol. 20(17):6224-6232.
- Matsumoto, K., Nagata, K., Miyaji-Yamaguchi, M., Kikuchi, A. y Tsujimoto, M.** 1999. *Sperm chromatin decondensation by template activating factor I through direct interaction with basic proteins.* Mol. Cell. Biol. 19(10): 6940-6952.
- Mazurek, S., Zwerschke, W., Jansen-Dürr, P. y Eigenbrodt, E.** 2001. *Effects of the human papilloma virus HPV-16 E7 oncoprotein on glycolysis and glutaminolysis: role of pyruvate kinase type M2 and the glycolytic enzyme complex.* Biochem. J. 356(Pt): 247-256.
- Mazurek, S. y Eigenbrodt, E.** 2003. *The tumor metabolome.* Anticancer Res. 23(2A): 1149-1154.
- Mazurek, S., Boschek, C. B., Hugo, F. y Eigenbrodt, E.** 2005. *Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading.* Semin. Cancer. Biol. 15(4): 300-308.
- Mazurek, S.** 2007. *Pyruvate kinase type M2: a key regulator within the tumour metabolome and a tool for metabolic profiling of tumours.* Ernst. Schering. Found. Symp. Proc. (4): 99-124.
- Mazurek, S., Drexler, H. C. A., Troppmair, J., Eigenbrodt, E. y Rapp, U. R.** 2007. *Regulation of pyruvate kinase type M2 by A-Raf: a possible stop or go mechanism.* Anticancer Res. 27(6B): 3963-3972.
- Mazurek, S.** 2011. *Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells.* Int. J. Biochem. Cell Biol. 43(7): 969-980.
- Michalewsky, J., Gabriel, T. F., Winter, D. P., Makofske, R., Danho, W., Shively, J., Biemann, K. y Meienhofer, J.** Confirmation of the primary structure of thymosin  $\alpha_1$  by microsequence analysis of limited acid and enzymatic hydrolysis fragments. Int. J. Pept. Protein Res. 21(1): 93-99.
- Millard, S. S., Vidal, A., Markus, M. y Koff, A.** A U-rich element in the 5' untranslated region is necessary for the translation of p27 mRNA. Mol. Cell. Biol. 20(16): 5947-5959.
- Mol, P. C., Wang, R. H., Batey, D. W., Lee, L. A., Dang, C. V. y Berger, S. L.** 1995. *Do products of the myc proto-oncogene play a role in transcriptional regulation of the prothymosin  $\alpha$  gene?* Mol. Cell. Biol. 15(12): 6999-7009.
- Mori, M., Barnard, G. F., Staniunas, R. J., Jessup, J. M., Steele, G. D. Jr. y Chen, L. B.** 1993. *Prothymosin  $\alpha$  mRNA expression correlates with that of c-myc in human colon cancer.* Oncogene 8(10): 2821-2826.

- Moule, S. K. y McGivan, J. D.** 1991. *Epidermal growth factor stimulates the phosphorylation of pyruvate kinase in freshly isolated rat hepatocytes*. FEBS Lett. 280(1): 37-40.
- Mullapudi, S. R. S., Ali-Osman, F., Shou, J. y Srivenugopal, K. S.** 2000. *DNA repair protein oalkylguanine-DNA alkyltransferase is phosphorylated by two distinct and novel protein kinases in human brain tumor cells*. Biochem. J. 351 (2000): 393-402.
- Muñoz, V. y Serrano, L.** 1995. *Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters. II. Helix macrodipole effects and rational modification of the helical content of natural peptides*. J. Mol. Biol. 245: 275-296.
- Muñoz, M .E. y Ponce, E.** 2003. *Pyruvate kinase: current status of regulatory and functional properties*. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 135(2): 197-218.
- Nagata, K., Kawase, H., Handa, H., Yano, K., Yamasaki, M., Ishimi, Y., Okuda, A., Kikuchi, A. y Matsumoto, K.** 1995. *Replication factor encoded by a putative oncogene, set, associated with myeloid leukemogenesis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92(10): 4279-4283.
- Naumann, U., Eisenmann-Tappe, I. y Rapp, U. R.** 1997. *The role of Raf kinases in development and growth of tumors*. Recent Results Cancer Res. 143: 237-244.
- Netzker, R., Greiner, E., Eigenbrodt, E., Noguchi, T., Tanaka, T. y Brand, K.** 1992. *Cell cycle-associated expression of M2-type isozyme of pyruvate kinase in proliferating rat thymocytes*. J. Biol. Chem. 267(9): 6421-6424.
- Noguchi, T., Inoue, H. y Tanaka, T.** 1986. *The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing*. J. Biol. Chem. 261 (1986): 13807-13812.
- Noguchi, T., Yamada K., Inoue, H., Matsuda, T. y Tanaka, T.** 1987. *The L- and R-type isozymes of rat,pyruvate kinase are produced from a single gene by use of different promoters*.J. Biol. Chem. 262(29): 14366-14371.
- Nogueira, M. y Freire, M.** 1985. *Characteristics of the translation of thymosin  $\alpha$ 1 precursor mRNA by cell-free wheat germ system. Evidence for the acetylation of thymosin  $\alpha$ 1 precursor*. Int. J. Biochem. 17(4): 533-536.
- Oak, M. H., Cheong, H. y Kim, K. M.** 1999. *Activation of Fc  $\epsilon$  RI inhibits the pyruvate kinase through direct interaction with the  $\gamma$ -chain*. Int. Arch. Allergy Immunol. 119(2): 95-100.
- Okuwaki, M. y Nagata, K.** 1998. *Template activating factor-I remodels the chromatin structure and stimulates transcription from the chromatin template*. J. Biol. Chem. 273(51): 34511-34518.

- Orre, R. S., Cotter, M. A., Subramanian, C. y Robertson, E. S.** 2001. *Prothymosin  $\alpha$  functions as a cellular oncoprotein by inducing transformation of rodent fibroblasts in vitro*. J. Biol. Chem. 276(3): 1794-1799.
- Otero, A., Bustelo, X. R., Pichel, J. G., Freire, M. y Gómez-Márquez, J.** 1993. *Transcript levels of thymosin  $\beta_4$ , an actin-sequestering peptide, in cell proliferation*. Biochim. Biophys. Acta. 1176(1-2): 59-63.
- Oude Weernink, P. A., Rijksen, G., van der Heijden, M. C. M., Staal, G. E. J.** 1990. *Phosphorylation of pyruvate kinase type K in human gliomas by a cyclic adenosine 5'-monophosphate-independent protein kinase*. Cancer Res. 50(15): 4604-4610.
- Padmanabhan, B., Nakamura, Y. y Yokoyama, S.** 2008. *Structural analysis of the complex of Keap1 with a prothymosin alpha peptide*. Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. 64(Pt 4): 233-238.
- Palvimo, J. y Linnala-Kankkunen, A.** 1990. *Identification of a low-Mr acidic nuclear protein as prothymosin  $\alpha$* . FEBS Lett. 277(1-2): 257-260.
- Pan, L. X., Haritos, A. A., Wideman, J., Komiyama, T., Chang, M., Stein, S., Salvin, S. B. y Horecker, B. L.** 1986. *Human prothymosin  $\alpha$ : amino acid sequence and immunologic properties*. Arch. Biochem. Biophys. 250(1): 197-201.
- Panneerselvam, C., Haritos, A. A., Caldarella, J. y Horecker, B. L.** 1987. *Prothymosin  $\alpha$  in human blood*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84(13): 4465-4469.
- Panneerselvam, C., Wellner, D. y Horecker, B. L.** 1988. *The amino acid sequence of bovine thymus prothymosin  $\alpha$* . Arch. Biochem. Biophys. 265(2): 454-457.
- Papamarcaki, T. y Tsolas, O.** 1994. *Prothymosin  $\alpha$  binds to histone H1 in vitro*. FEBS Lett. 345(1): 71-75.
- Pavlov, N., Evstafieva, A., Rubtsov, Y. y Vartapetian, A.** 1995. *Human prothymosin  $\alpha$  inhibits division of yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells, while its mutant lacking nuclear localization signal does not*. FEBS Lett. 366(1): 43-45.
- Pearson, R. B. y Kemp, B. E.** 1991. *Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations*. Methods Enzymol. 200: 62-81.
- Pérez-Estévez, A., Díaz-Jullien, C., Covelo, G., Salgueiro, M. T. y Freire, M.** 1997. *A 180-kDa protein kinase seems to be responsible for the phosphorylation of prothymosin  $\alpha$  observed in proliferating cells*. J. Biol. Chem. 272(16): 10506-10513.
- Pérez-Estévez, A., Freire, J., Sarandeses, C., Covelo, G., Díaz-Jullien, C. y Freire, M.** 2000. *Properties of the protein kinase that phosphorylates prothymosin  $\alpha$* . Mol. Cell. Biochem. 208(1-2): 111-118.

- Philpott, A., Krude, T. y Laskey, R. A.** 2000. *Nuclear chaperones*. Semin. Cell Dev. Biol. 11(1): 7-14.
- Pinna, L. A.** 1990. *Casein kinase 2: an 'eminence grise' in cellular regulation?*. Biochim. Biophys. Acta. 1054(3): 267-284.
- Piñeiro, A., Cordero, O. J. y Nogueira, M.** 2000. *Fifteen years of prothymosin  $\alpha$ : contradictory past and new horizons*. Peptides. 21(9): 1433-1446.
- Piñeiro, A., Bugía, B. M., Arias, M. P., Cordero, O. J. y Nogueira, M.** 2001. *Identification of receptors for prothymosin  $\alpha$  on human lymphocytes*. Biol. Chem. 382(10): 1473-1482.
- Presek, P., Glossmann, H., Eigenbrodt, E., Schoner, W., Rübsamen, H., Friis, R. R. y Bauer, H.** 1980. *Similarities between a phosphoprotein (pp60src)-associated protein kinase of Rous sarcoma virus and a cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-independent protein kinase that phosphorylates pyruvate kinase type M2*. Cancer Res. 40(5): 1733-1741.
- Presek, P., Reinacher, M. y Eigenbrodt, E.** 1988. *Pyruvate kinase type M2 is phosphorylated at tyrosine residues in cells transformed by Rous sarcoma virus*. FEBS Lett. 242(1): 194-198.
- Qi, X., Wang, L. y Du, F.** 2010. *Novel small molecules relieve prothymosin  $\alpha$ -mediated inhibition of apoptosome formation by blocking its interaction with Apaf-1*. Biochemistry. 49(9): 1923-1930.
- Qin, X. Q., Livingston, D. M., Kaelin, W. G. Jr. y Adams, P. D.** 1994. *Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91(23): 10918-10922.
- Reinacher, M., Eigenbrodt, E., Schering, B. y Schoner, W.** 1979. *Immunohistochemical localization of pyruvate kinase isoenzymes in chicken tissues*. Histochemistry. 64(2): 145-161.
- Reinacher, M. y Eigenbrodt, E.** 1981. *Immunohistological demonstration of the same type of pyruvate kinase isoenzyme (M2-PK) in tumors of chicken and rat*. Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol. 37(1): 79-88.
- Rey-Campos, J., Rey-Méndez, M. y Freire, M.** 1983. *Synthesis of thymosin  $\alpha_1$  precursor cDNA and purification of active mRNA by affinity chromatography*. Int. J. Biochem. 15(2): 155-157.
- Rich, T., Allen, R. L. y Wyllie, A. H.** 2000. *Defying death after DNA damage*. Nature. 407(6805): 777-783.

Rodríguez, J. y Lazebnik, Y. 1999. *Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme*. Genes Dev. 13(24): 3179-3184.

Rodríguez, P., Viñuela, J. E., Alvarez-Fernández, L., Buceta, M., Vidal, A., Domínguez, F. y Gómez-Márquez, J. 1998. *Overexpression of prothymosin alpha accelerates proliferation and retards differentiation in HL-60 cells*. Biochem. J. 331 (Pt 3): 753-761.

Rodríguez, P., Viñuela, J.E., Álvarez-Fernández, L. y Gómez-Márquez, J. 1999. *Prothymosin  $\alpha$  antisense oligonucleotides induce apoptosis in HL-60 cells*. Cell Death Differ. (1): 3-5.

Rodríguez, P., Ruiz, M. T., Price, G. B. y Zannis-Hadjopoulos, M. 2004. *NAP-2 is part of multi-protein complexes in HeLa cells*. J. Cell Biochem. 93(2): 398-408.

Rodríguez-Horche, P., Luque, J., Perez-Artes, E., Pineda, M. y Pinilla, M. 1987. *Comparative kinetic behaviour and regulation by fructose-1,6-bisphosphate and ATP of pyruvate kinase from erythrocytes, reticulocytes and bone marrow cells*. Comp. Biochem. Physiol. B. 87(3): 553-557.

Rosón, E., Gallego, R., García-Caballero, T., Heimer, E. P., Félix, A. M. y Domínguez, F. 1990. *Prothymosin  $\alpha$  expression is associated to cell division in rat testis*. Histochemistry. 94(6): 597-599.

Rubtsov Y. P. y Vartapetian A .B. 1995. *New intronless members of human prothymosin  $\alpha$  genes*. Mol. Biol. (Mosk). 29(6): 1320-1325.

Rubtsov, Y. P., Zolotukhin, A. S., Vorobjev, I. A., Chichkova, N. V., Pavlov, N. A., Karger, E. M., Evstafieva, A. G., Felber, B. K. y Vartapetian, A. B. 1997. *Mutational analysis of human prothymosin  $\alpha$  reveals a bipartite nuclear localization signal*. FEBS Lett. 413(1): 135-141.

Rushmore, T. H., Morton, M. R. y Pickett, C. B. 1991. *The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity*. J. Biol. Chem. 266(18): 11632-11639.

Ryu, H., Walker, J. K., Kim, S., Koo, N., Barak, L. S., Noguchi, T., Kang, B. Y. y Kim, K. M. 2008. *Regulation of M2-type pyruvate kinase mediated by the high-affinity IgE receptors is required for mast cell degranulation*. Br. J. Pharmacol. 2008 154(5): 1035-46.

Safer, D., Golla, R. y Nachmias, V. T. 1990. *Isolation of a 5-kDa actin-sequestering peptide from human blood platelets*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87(7): 2536-2540.

Safer, D., Elzinga, M. y Nachmias, V.T. 1991. *Thymosin  $\beta_4$  and Fx, an actin-sequestering peptide, are indistinguishable*. J. Biol. Chem. 266(7): 4029-4032.

- Salvin, S. B., Horecker, B. L., Pan, L. X. y Rabin, B. S.** 1987. *The effect of dietary zinc and prothymosin  $\alpha$  on cellular immune responses of RF/J mice*. Clin. Immunol. Immunopathol. 43(3): 281-288.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T.** 1989. In: C. Nolan (ed). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarandeses, C. S., Covelo, G., Díaz-Jullien, C. y Freire, M.** 2003. *Prothymosin  $\alpha$  is processed to thymosin  $\alpha_1$  and thymosin  $\alpha_{11}$  by a lysosomal asparaginyl endopeptidase*. J. Biol. Chem. 278(15): 13286-13293.
- Sasaki, H., Nonaka, M., Fujii, Y., Yamakawa, Y., Fukai, I., Kiriyaama, M. y Sasaki M.** 2001a. *Expression of the prothymosin  $\alpha$  gene as a prognostic factor in lung cancer*. Surg Today. 31(10): 936-938.
- Sasaki, H., Sato, Y., Kondo, S., Fukai, I., Kiriyaama, M., Yamakawa, Y. y Fujii, Y.** 2001b. *Expression of the prothymosin  $\alpha$  mRNA correlated with that of N-myc in neuroblastoma*. Cancer Lett. 168(2): 191-195.
- Sburlati, A. R., Manrow, R. E. y Berger, S. L.** 1990. *Human prothymosin  $\alpha$ : purification of a highly acidic nuclear protein by means of a phenol extraction*. Protein Expr. Purif. 1(2):184-190.
- Sburlati, A. R., Manrow, R. E. y Berger, S. L.** 1991. *Prothymosin  $\alpha$  antisense oligomers inhibit myeloma cell division*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88(1): 253-257.
- Sburlati, A. R., De La Rosa, A., Batey, D. W., Kurys, G. L., Manrow, R. E., Pannell, L. K., Martin, B. M., Sheeley, D. M. y Berger, S. L.** 1993. *Phosphorylation of human and bovine prothymosin  $\alpha$  in vivo*. Biochemistry. 32(17): 4587-4596.
- Schäfer, D., Hamm-Künzelmann, B., Hermfisse, U. y Brand, K.** 1996. *Differences in DNA-binding efficiency of Sp1 to aldolase and pyruvate kinase promoter correlate with altered redox states in resting and proliferating rat thymocytes*. FEBS Lett. 391(1-2): 35-38.
- Schneider, J., Neu, K., Grimm, H., Velcovsky, H. G., Weisse, G. y Eigenbrodt, E.** 2002. *Tumor M2-pyruvate kinase in lung cancer patients: immunohistochemical detection and disease monitoring*. Anticancer Res. 22(1A): 311-318.
- Selvakumaran, M., Lin, H.K., Miyashita, T., Wang, H. G., Krajewski, S., Reed, J. C., Hoffman, B. y Liebermann, D.** 1994. *Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways*. Oncogene. 9(6): 1791-1798.

- Seo, S. B., McNamara, P., Heo, S., Turner, A., Lane, W. S. y Chakravarti, D.** 2001. *Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein.* Cell. 104(1): 119-30.
- Shalak, V., Kaminska, M., Mitnacht-Kraus, R., Vandenabeele, P., Clauss, M. y Mirande, M.** 2001. *The EMAPII cytokine is released from the mammalian multisynthetase complex after cleavage of its p43/proEMAPII component.* J. Biol. Chem. 276(26): 23769-23776.
- Shikama, N., Chan, H. M., Krstic-Demonacos, M., Smith, L., Lee, C. W., Cairns, W. y La Thangue, N. B.** 2000. *Functional interaction between nucleosome assembly proteins and p300/CREB-binding protein family coactivators.* Mol. Cell Biol. 20(23): 8933-8943.
- Shimada, N., Shinagawa, T. y Ishii, S.** 2008. *Modulation of M2-type pyruvate kinase activity by the cytoplasmic PML tumor suppressor protein.* Genes Cells. 13(3):245-254.
- Shishodia, S. y Aggarwal, B. B.** 2002. *Nuclear factor  $\kappa$ B activation: a question of life or death.* J. Biochem. Mol. Biol. 35(1): 28-40.
- Shishodia, S. y Aggarwal, B. B.** 2004. *Nuclear factor  $\kappa$ B activation mediates cellular transformation, proliferation, invasion angiogenesis and metastasis of cancer.* Cancer Treat. Res. 119: 139-173
- Shiwa, M., Nishimura, Y., Wakatabe, R., Fukawa, A., Arikuni, H., Ota, H., Kato, Y. y Yamori, T.** 2003. *Rapid discovery and identification of a tissue-specific tumor biomarker from 39 human cancer cell lines using the SELDI ProteinChip platform.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 309(1): 18-25.
- Siwko, S. y Mochly-Rosen, D.** 2007. *Use of a novel method to find substrates of protein kinase C delta identifies M2 pyruvate kinase.* Int. J. Biochem. Cell Biol. 39(5): 978-987.
- Smart, N., Risebro, C. A., Melville, A. A., Moses, K., Schwartz, R. J., Chien, K. R. y Riley, P. R.** 2007. *Thymosin  $\beta_4$  induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization.* Nature. 445: 177-182.
- Schmidt, G. y Werner, D.** 1991. *Nucleotide sequence of the murine prothymosin alpha cDNA and its deduced primary and secondary protein structure.* Biochim. Biophys. Acta. 1088(3): 442-444.
- Smith, M. R., al-Katib, A., Mohammad, R., Silverman, A., Szabo, P., Khilnani, S., Kohler, W., Nath, R. y Mutchnick, M. G.** 1993. *Prothymosin  $\alpha$  gene expression correlates with proliferation, not differentiation, of HL-60 cells.* Blood 82(4): 1127-1132.
- Smith, M. R.** 1995. *Prothymosin  $\alpha$ : in search of a function.* Leuk. Lymphoma. 18(3-4): 209-214.

- Socolovsky, M., Nam, H., Fleming, M. D., Haase, V. H., Brugnara, C. y Lodish, H. F.** 2001. *Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts*. Blood. 98(12): 3261-3273.
- Spector, D. L., Goldman, R. D. y Leinwand, L. A.** 1998. *Cells: A Laboratory Manual. Subcellular Localization of Genes and Their Products*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vol.3. 105: 1-4.
- Spoden, G. A., Morandell, D., Eehalt, D., Fiedler, M., Jansen-Dürr, P., Hermann, M., Zwerschke, W.** 2009. *The SUMO-E3 ligase PIAS3 targets pyruvate kinase M2*. J. Cell. Biochem. 107(2): 293-302.
- Staal, G. E. J. y Rijksen, G.** 1991. Biochemical and molecular aspects of selected cancers. In: Pretlow, T.G., Pretlow, T.P. (ed.). *Pyruvate kinase in selected human tumors*. Academic Press. San Diego. 313-337.
- Stephanou, A., Brar, B. K., Knight, R. A. y Latchman, D. S.** 2000. *Opposing actions of STAT-1 and STAT-3 on the Bcl-2 and Bcl-x promoters*. Cell Death Differ. 7(3): 329-330.
- Stępkowski, T. M. y Kruszewski, M. K.** 2011. *Molecular cross-talk between the NRF2/KEAP1 signaling pathway, autophagy, and apoptosis*. Free Radic. Biol. Med. 50(9): 1186-1195.
- Steinberg, P., Klingelhöffer, A., Schäfer, A., Wüst, G., Weisse, G., Oesch, F. y Eigenbrodt, E.** 1999. *Expression of pyruvate kinase M2 in preneoplastic hepatic foci of N-nitrosomorpholine-treated rats*. Virchows Arch. 434(3): 213-220.
- Subramanian, C., Hasan, S., Rowe, M., Hottiger, M., Orre, R. y Robertson, E. S.** 2002. *Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and prothymosin  $\alpha$  interact with the p300 transcriptional coactivator at the CH1 and CH3/HAT domains and cooperate in regulation of transcription and histone acetylation*. J. Virol. 76(10): 4699-4708.
- Szabo, P. y Weksler, M. E.** 1992. *Is thymosin  $\alpha_1$  a thymic hormone?* Clin. Immunol. Immunopathol. 65(3): 195-200.
- Szabo, P., Panneerselvam, C., Clinton, M., Frangou-Lazaridis, M., Weksler, D., Whittington, E., Macera, M. J., Grzeschik, K. H., Selvakumar, A. y Horecker, B. L.** 1993. *Prothymosin  $\alpha$  gene in humans: organization of its promoter region and localization to chromosome 2*. Hum. Genet. 90(6): 629-634.
- Takenaka, M., Noguchi, T., Sadahiro, S., Hirai, H., Yamada, K., Matsuda, T., Imai, E. y Tanaka, T.** 1991. *Isolation and characterization of the human pyruvate kinase M gene*. Eur. J. Biochem. 198(1): 101-106.



- Tang, T. T., Dowbenko, D., Jackson, A., Toney, L., Lewin, D. A., Dent, A. L. y Lasky, L. A.** 2002. *The forkhead transcription factor AFX activates apoptosis by induction of the BCL-6 transcriptional repressor*. J. Biol. Chem. 277(16): 14255-14265.
- Tani, K., Yoshida, M. C., Satoh, H., Mitamura, K., Noguchi, T., Tanaka, T., Fujii, H. y Miwa, S.** 1988. *Human M2-type pyruvate kinase: cDNA cloning, chromosomal assignment and expression in hepatoma*. Gene. 73(2): 509-516.
- Thornberry, N. A. y Lazebnik, Y.** 1998. *Caspases: enemies within*. Science. 281(5381): 1312-1316.
- Trumbore, M. W. y Berger, S.L.** 2000. *Prothymosin  $\alpha$  is a nonspecific facilitator of nuclear processes: studies of run-on transcription*. Protein Expr. Purif. 20(3): 414-20.
- Tsitsiloni, O. E., Yialouris, P. P., Sekeri-Pataryas, K. y Haritos, A. A.** 1989. *Prothymosin  $\alpha$  is not a nuclear polypeptide*. Experientia. 45(4): 332-334.
- Tsitsiloni, O. E., Stiakakis, J., Koutselinis, A., Gogas, J., Markopoulos, C., Yialouris, P., Bekris, S., Panoussopoulos, D., Kiortsis, V. y Voelter, W.** 1993. *Expression of  $\alpha$ -thymosins in human tissues in normal and abnormal growth*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90(20): 9504-9507.
- Turkson, J. y Jove, R.** 2000. *STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery*. Oncogene. 19(56): 6613-6626.
- Uversky, V. N., Gillespie, J. R., Millett, I. S., Khodyakova, A. V., Vasiliev, A. M., Chernovskaya, T. V., Vasilenko, R. N., Kozlovskaya, G. D., Dolgikh, D. A., Fink, A. L., Doniach, S. y Abramov, V. M.** 1999. *Natively unfolded human prothymosin  $\alpha$  adopts partially folded collapsed conformation at acidic pH*. Biochemistry. 38(45): 15009-15016.
- Van der Geer, P., Luo, K., Sefton, B. M. y Hunter, T.** Protein phosphorylation, in: D. G. Hardie (Ed.). *Phosphopeptide Mapping and Phosphoaminoacid Analysis on Cellulose Thin-Layer Plates*. IRL Press. Oxford. 31-59.
- Vancompernelle, K., Goethals, M., Huet, C., Louvard, D. y Vandekerckhove, J.** 1992. *G- to F-actin modulation by a single amino acid substitution in the actin binding site of actobindin and thymosin  $\beta_4$* . EMBO J. 11: 4739-4746.
- Vareli, K., Frangou-Lazaridis, M. y Tsolas, O.** 1995. *Prothymosin  $\alpha$  mRNA levels vary with c-myc expression during tissue proliferation, viral infection and heat shock*. FEBS Lett. 371(3): 337-340.
- Vareli, K., Tsolas, O. y Frangou-Lazaridis, M.** 1996. *Regulation of prothymosin  $\alpha$  during the cell cycle*. Eur. J. Biochem. 238(3): 799-806.

- Vareli, K., Frangou-Lazaridis, M., van der Kraan, I., Tsolas, O. y van Driel, R. 2000. *Nuclear distribution of prothymosin  $\alpha$  and parathymosin: evidence that prothymosin  $\alpha$  is associated with RNA synthesis processing and parathymosin with early DNA replication*. Exp. Cell. Res. 257(1): 152-161.
- Vareli, K. y Frangou-Lazaridis, M. 2004. *Prothymosin  $\alpha$  is localized in mitotic spindle during mitosis*. Biol. Cell. 96(6): 421-8.
- Vega, F. V., Vidal, A., Hellman, U., Wernstedt, C. y Domínguez, F. 1998. *Prothymosin  $\alpha$  stimulates  $Ca^{+2}$ -dependent phosphorylation of elongation factor 2 in cellular extracts*. J. Biol. Chem. 273(17): 10147-10152.
- Verhagen, A. M., Silke, J., Ekert, P. G., Pakusch, M., Kaufmann, H., Connolly, L. M., Day, C. L., Tikoo, A., Burke, R., Wrobel, C., Moritz, R. L., Simpson, R. J. y Vaux, D. L. 2001. *HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins*. J. Biol. Chem. 277(1): 445-454.
- Villar, M., Ortega-Pérez, I., Were, F., Cano, E., Redondo, J. M. y Vázquez, J. 2006. *Systematic characterization of phosphorylation sites in NFATc2 by linear ion trap mass spectrometry*. Proteomics. 6 :S16-S27.
- Vogelstein, B., Lane, D. y Levine, A. J. 2000. *Surfing the p53 network*. Nature. 408(6810): 307-310.
- Wang, C., Fu, M., Angeletti, R. H., Siconolfi-Baez, L., Reutens, A. T., Albanese, C., Lisanti, M. P., Katzenellenbogen, B. S., Kato, S., Hopp, T., Fuqua, S. A., Lopez, G. N., Kushner, P. J. y Pestell, R. G. 2001. *Direct acetylation of the estrogen receptor  $\alpha$  hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity*. J. Biol. Chem. 276(21): 18375-18383.
- Wang, K. C., Cheng, A. L., Chuang, S. E., Hsu, H. C. y Su, I. J. 2000. *Retinoic acid-induced apoptotic pathway in T-cell lymphoma: Identification of four groups of genes with differential biological functions*. Exp. Hematol. 28(12): 1441-1450.
- Wang X. 2001. *The expanding role of mitochondria in apoptosis*. Genes Dev. 15(22): 2922-2933.
- Warburg, O., Poesener, K. y Negelein, E. 1924. *Über den Stoffwechsel der Tumoren*. Biochem. Z. 152: 319-44.
- Watts, J. D., Cary, P. D. y Crane-Robinson, C. 1989. *Prothymosin  $\alpha$  is a nuclear protein*. FEBS Lett. 245(1-2): 17-20.
- Watts, J. D., Cary, P. D., Sautiere, P. y Crane-Robinson, C. 1990. *Thymosins: both nuclear and cytoplasmic proteins*. Eur. J. Biochem. 192(3): 643-651.

- Weber, K. y Osborn, M.** 1969. *The reliability of molecular weight determinations by dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*. J. Biol. Chem. 244(16): 4406-4412.
- Weiss, M. A., Ellenberger, T., Wobbe, C. R., Lee, J. P., Harrison, S. C. y Struhl, K.** 1990. *Folding transition in the DNA-binding domain of GCN4 on specific binding to DNA*. Nature. 347(6293): 575-578.
- Wintero, A. K., Fredholm, M. y Davies, W.** 1996. *Evaluation and characterization of a porcine small intestine cDNA library: analysis of 839 clones*. Mamm. Genome 7(7): 509-517.
- Wu, C. D., Kuo, Y. S., Wu, H. C. y Lin, C. T.** 2011. *MicroRNA-1 induces apoptosis by targeting prothymosin  $\alpha$  in nasopharyngeal carcinoma cells*. J. Biomed. Sci. 18: 80.
- Wu, C. G., Boers, W., Reitsma, P. R., van Deventer, S. J. y Chamuleau, R. A.** 1997. *Overexpression of prothymosin  $\alpha$ , concomitant with c-myc, during rat hepatic carcinogenesis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 232(3): 817-821.
- Wu, C. L., Shiau, A. L. y Lin, C. S.** 1997. *Prothymosin  $\alpha$  promotes cell proliferation in NIH3T3 cells*. Life Sci. 61(21): 2091-2101.
- Yamada, K. y Noguchi, T.** 1999a. *Regulation of pyruvate kinase M gene expression*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 256(2): 257-262.
- Yamada, K. y Noguchi, T.** 1999b. *Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression*. Biochem. J. 337 ( Pt 1): 1-11.
- Yang, C. H., Shi, W., Basu, L., Murti, A., Constantinescu, S. N., Blatt, L., Croze, E., Mullersman, J. E. y Pfeffer, L. M.** 1996. *Direct association of STAT3 with the IFNAR-1 chain of the human type I interferon receptor*. J. Biol. Chem. 271(14): 8057-61.
- Yang, C. H., Murti, A. y Pfeffer, L. M.** 1998. *STAT3 complements defects in an interferon-resistant cell line: evidence for an essential role for STAT3 in interferon signaling and biological activities*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95(10): 5568-5572.
- Yang, C. H., Murti, A., Baker, S. J., Frangou-Lazaridis, M., Vartapetian, A. B., Murti, K. G. y Pfeffer, L. M.** 2004. *Interferon induces the interaction of prothymosin  $\alpha$  with STAT3 and results in the nuclear translocation of the complex*. Exp. Cell. Res. 298(1): 197-206.
- Yang, W., Xia, Y., Ji, H., Zheng, Y., Liang, J., Huang, W., Gao, X., Aldape, K. y Lu, Z.** 2011. *Nuclear PKM2 regulates  $\beta$ -catenin transactivation upon EGFR activation*. Nature. 480(7375): 118-122.

- Yialouris, P. P., Evangelatos, G. P., Soteriadis-Vlahos, C., Heimer, E. P., Félix, A. M., Tsitsiloni, O. E. y Haritos, A. A.** 1988. *The identification of prothymosin  $\alpha$ -like material in vertebrate lymphoid organs by a radioimmunoassay for the N-terminal decapeptide.* J. Immunol. Methods 106(2): 267-275.
- Zakharova, N. I., Sokolov, V. V., Suvorova, A. A., Shiau, A. I., Wu, C. L. y Evstafieva, A. G.** 2011. *Prothymosin  $\alpha$  interacts with C-terminal domain of histone H1 and dissociates p53-histone H1 complex.* Mol. Biol. (Mosk). 45(4): 679-488.
- Zalvide, J. B., Cancio, E., Alvarez, C. V., Regueiro, B. J. y Domínguez, F.** 1992. *Prothymosin  $\alpha$  mRNA levels are invariant throughout the cell cycle.* J. Biol. Chem. 267(12): 8692-8695.
- Zav'yalov, V. P., Navolotskaya, E. V., Abramov, V. M., Galaktionov, V. G., Isaev, I. S., Kaurov, O. A., Kozhich, A. T., Maiorov, V. A., Prusakov, A. N. y Vasilenko, R. N.** 1991. *The octapeptide corresponding to the region of the highest homology between  $\alpha$ -interferon and thymosin  $\alpha_1$  effectively competes with both cytokines for common high-affinity receptors on murine thymocytes.* FEBS Lett. 278(2): 187-189.
- Zhang, D. D. y Hannink, M.** 2003. *Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress.* Mol. Cell. Biol. 23(22): 8137-8151
- Zhang, Y., Center, D. M., Wu, D. M., Cruikshank, W. W., Yuan, J., Andrews, D. W. y Kornfeld, H.** 1998. *Processing and activation of pro-interleukin-16 by caspase-3.* J. Biol. Chem. 273(2): 1144-1149.
- Zhao, R., Gish, K., Murphy, M., Yin, Y., Notterman, D., Hoffman, W. H., Tom, E., Mack, D. H. y Levine, A. J.** 2000. *The transcriptional program following p53 activation.* Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 65: 475-82.
- Zindy, F., Eischen, C. M., Randle, D. H., Kamijo, T., Cleveland, J. L., Sherr, C. J. y Roussel, M. F.** 1998. *Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization.* Genes Dev. 12(15): 2424-2433.
- Zou, H., Yang, R., Hao, J., Wang, J., Sun, C., Fesik, S. W., Wu, J. C., Tomaselli, K. J. y Armstrong, R. C.** 2003. *Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP.* J. Biol. Chem. 278(10): 8091-8098.
- Zwerschke, W., Mazurek, S., Massimi, P., Banks, L., Eigenbrodt, E. y Jansen-Dürr, P.** 1999. *Modulation of type M2 pyruvate kinase activity by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96 (4): 1291-1296.

**PUBLICACIONES**





# The M2-type isoenzyme of pyruvate kinase phosphorylates prothymosin $\alpha$ in proliferating lymphocytes

Cristina Díaz-Jullien, David Moreira, Concepción Sofía Sarandeses, Guillermo Covelo, Pablo Barbeito, Manuel Freire\*

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, CIBUS, Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 21 July 2010

Received in revised form 29 September 2010

Accepted 15 October 2010

Available online 23 October 2010

### Keywords:

Prothymosin

M2 pyruvate kinase

Phosphorylation

Proliferation

## ABSTRACT

Prothymosin  $\alpha$  (ProT $\alpha$ ) is a multifunctional protein that, in mammalian cells, is involved in nuclear metabolism through its interaction with histones and that also has a cytosolic role as an apoptotic inhibitor. ProT $\alpha$  is phosphorylated by a protein kinase (ProT $\alpha$ K), the activity of which is dependent on phosphorylation. ProT $\alpha$  phosphorylation also correlates with cell proliferation. Mass spectrometric analysis of ProT $\alpha$ K purified from human tumor lymphocytes (NC37 cells) enabled us to identify this enzyme as the M2-type isoenzyme of pyruvate kinase. A study on the relationship between ProT $\alpha$ K activity and pyruvate kinase isoforms in NC37 cells and in other cell types confirmed that the M2 isoform is the enzyme responsible for ProT $\alpha$ K activity in proliferating cells. Yet, about 10% of the cellular pool of the M2 isoform shows specific affinity for ProT $\alpha$  and is responsible for ProT $\alpha$ K activity. This pool of M2 protein possesses no observable pyruvate kinase activity and changes its responses to various effectors of pyruvate kinase activity; however, these responses to PK effectors are maintained by the main cellular fraction containing the M2 isoform. Acquisition of ProT $\alpha$ K activity by M2 seems to be due to the phosphorylation of serine and threonine residues, which, besides being essential for its catalytic activity, induces a trimeric association of ProT $\alpha$ K. This association can be shifted to a tetrameric form by fructose 1, 6-bisphosphate, which results in a decrease in ProT $\alpha$ K activity.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Prothymosin  $\alpha$  (ProT $\alpha$ )<sup>1</sup> is a protein of 109 to 111 amino acids that is widely distributed in mammalian tissues and particularly abundant in lymphoid cells [1–3]. Structurally, ProT $\alpha$  has a highly conserved sequence, which includes a central acidic region (residues 41–85) comprised of Glu and Asp residues [4], a karyophilic signal at its C-terminus [5], and a 28-amino-acid sequence at its N-terminus corresponding to thymosin  $\alpha_1$  (T $\alpha_1$ ), of which ProT $\alpha$  is the precursor [6]. Regarding its biological function, current evidence indicates that ProT $\alpha$  is a multifunctional protein. Early research demonstrated that ProT $\alpha$  plays an essential role in cell division, as established by experiments with antisense oligonucleotides [7] and gene expression analyses [8–10]. Regarding its involvement in cell division, experimental data indicate that ProT $\alpha$  migrates to the nucleus, where it influences chromatin activity. Specifically, it has been shown to affect transcription activity through interactions with transcription factors [11–14] and histones [15–17]. Our recent results [18] showing that

ProT $\alpha$  interacts with core histones and with a nuclear complex containing the acetyltransferase and methyltransferase activities of histones H3 and H4 support the view that the nuclear function of ProT $\alpha$  in proliferating cells may be related to chromatin remodeling through interaction with, and modification of, core histones, especially H3 and H4.

Notwithstanding the evidence of this nuclear role of ProT $\alpha$ , cytoplasmic functions of ProT $\alpha$  have also been reported in recent years. The most important function of ProT $\alpha$  is its anti-apoptotic activity. ProT $\alpha$  inhibits the activation of caspase 3 through an unknown mechanism [19] in which an interaction with the protein p8 may be involved [20]. Moreover, as noted, proteolytic processing of part of ProT $\alpha$  in the cytoplasm gives rise to T $\alpha_1$  (28 amino acids) [21], which may have some biological function in its own right.

Cytosolic phosphorylation of ProT $\alpha$  also provides an additional clue to its biological function. Phosphorylation of ProT $\alpha$ , which occurs at threonine residues, is dependent on cell proliferation [22], but the biological significance of this phosphorylation remains unknown. The phosphorylation sites are within casein kinase-2 (CK-2; EC 2.7.11.1) consensus motifs that are located within the first 14 amino acids of the ProT $\alpha$  sequence. In fact, we found that CK-2 is able to phosphorylate ProT $\alpha$  *in vitro*, and CK-2 is able to phosphorylate serine and threonine residues in similar proportions [23]. We later isolated a cytoplasmic protein kinase, designated ProT $\alpha$ K, from various cell types, the properties of which indicate that it is the enzyme

Abbreviations: ProT $\alpha$ , prothymosin  $\alpha$ ; T $\alpha_1$ , thymosin  $\alpha_1$ ; CK-2, casein kinase-2; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; T3, 3'-5'-triiodo-L-thyronine; FBP, fructose 1,6-bisphosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; LDH, lactate dehydrogenase; PK, pyruvate kinase; ConA, concanavalin A; IL-2, interleukin-2; AS, ammonium sulfate

\* Corresponding author. Tel.: +34 981 563100x16930; fax: +34 981 596904.

E-mail address: [manuel.freire@usc.es](mailto:manuel.freire@usc.es) (M. Freire).

specifically responsible for the phosphorylation of ProTα in proliferating cells [24]. Studies of this protein kinase [24,25] isolated from murine splenocytes indicate that it has a molecular weight of 180 kDa, that it appears to be constituted by a protein(s) of 60 kDa, and that it phosphorylates ProTα at threonine residues located at positions 7 and 12 or 13, both *in vitro* and *in vivo*. Its phosphorylation sites, together with the inability of this protein to use GTP as an alternative phosphate donor and to phosphorylate casein, rule out the possibility that CK-2 is responsible for the phosphorylation of ProTα, at least in splenocytes. The activity of ProTαK correlates with cell proliferation activity, so that during cell cycle progression, ProTαK maintains its cytoplasmic location and reaches its highest levels of activity in the G1-S phase [25]. An important feature of ProTαK in splenic lymphocytes activated by concanavalin A (ConA) plus interleukin-2 (IL-2) is that its activity is also dependent on a phosphorylation process included in a signaling pathway that seems to be dependent on PKC activity, although this enzyme alone does not phosphorylate ProTαK [25].

The properties of ProTαK showed this enzyme to be a novel protein kinase that merited characterization. We have therefore undertaken studies aimed at the structural characterization of ProTαK. Here, we report experiments leading to the unexpected identification of ProTαK as part of the M2 isoform of PK (EC 2.7.1.40).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

The triethylammonium salt of adenosine 5'-[ $\gamma$ - $^{32}$ P] triphosphate ([ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP, 3000 Ci/mmol), [ $^{32}$ P] orthophosphate (1–60 Ci/mmol) and Protein A Sepharose were purchased from GE Healthcare Bio-Sciences. RPMI 1640, DMEM, PEP, FBP,  $\beta$ -NADH, ADP, L-LDH (from rabbit muscle), M1-PK (from rabbit muscle), 3'-5'-triiodo-L-thyronine (T3), streptavidin-agarose, Protein G agarose and anti-c-myc epitope antibodies were from Sigma. FBS and penicillin/streptomycin were from BioWhittaker. Lipofectamine 2000 and pcDNA 3.1 myc-His vector were from Invitrogen. Biotinylated alkaline phosphatase was from New England Biolabs. Orthophosphate-free DMEM was from MP Biomedicals. ProTα was purified from calf thymocytes as described [26]. All other reagents and materials were of analytical grade.

### 2.2. Cells and subcellular fractionation

Transformed human B lymphocytes (NC37 cells) were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin and subcellular fractionation was carried out as described [27]. Briefly, cytosol was obtained from homogenized cells (about  $5 \times 10^7$  cells/ml) by centrifugation at  $100,000 \times g$  (cytosolic fraction) and dialyzed against 50 mM Tris-HCl pH 7.5 buffer containing 5% glycerol (v/v), 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, and 40 mM NaF (buffer A).

HEK 293T (293T) cells were cultured adherently in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. Cells were lysed in buffer 150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.4, 1% Triton X-100, and 0.5% NP-40 for 30 min at 0 °C, then incubated with 80  $\mu$ g/ml Dnase I at room temperature for 1 h, and centrifuged at  $14,000 \times g$  for 15 min.

For metabolic labeling of proteins with [ $\gamma$ - $^{32}$ P] orthophosphate, cells were incubated for 4 h in orthophosphate-free DMEM medium, then for 14 h in orthophosphate-free DMEM medium containing 100  $\mu$ Ci/ml [ $\gamma$ - $^{32}$ P] orthophosphate.

Rabbit muscle cytosolic extract was prepared as described in Ref. [28].

### 2.3. ProTα expression vector and transfection

The full-length cDNA encoding human wild-type ProTα was subcloned into the pcDNA 3.1 expression vector, to express epitope-

tagged ProTα with His<sub>6</sub> and c-myc peptide (EQKLISEEDL) at its N- and C-terminus, respectively (constructed by GenScript). Mutant ProTα was generated by site-directed mutagenesis, replacing threonine 7 by alanine (T7A ProTα) (GenScript). These expression vectors were transfected into 293T cells using Lipofectamine following the manufacturer's instructions for 48 h (empty vector was used as control).

### 2.4. ProTαK activity assay

Assays of ProTαK activity in the different extracts were performed as previously described [24] in kinase assay buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM KCl, 1.6 mM EDTA, 1.6 mM EGTA, 26 mM MgCl<sub>2</sub>, 3.3 mM DTT, 83 mM  $\beta$ -glycerophosphate, and 5% glycerol) containing 0.1 mM [ $^{32}$ P] ATP. The reaction was stopped with Laemmli sample buffer, and the mixture was analyzed by SDS-PAGE with radiographic visualization of bands. Phosphorylation of ProTα was expressed in arbitrary units proportional to the amount of  $^{32}$ P incorporated into ProTα, as estimated by densitometric scanning of the radiographs. The effects of FBP (0.5, 2, or 5 mM), Mn<sup>2+</sup> (5, 10, or 15 mM), L-cysteine (0.05, 0.1, or 0.15 mM), L-alanine (0.5, 1, or 3 mM), or T3 (0.1, 0.5, or 1  $\mu$ M), on ProTαK activity were determined by adding the respective effectors at the indicated concentrations to the extracts, followed by 30-min incubations at 4 °C prior to activity assays.

The ability of PEP to replace ATP for transfer of orthophosphate to ProTα was assayed by adding 2 mM PEP to phosphorylation reaction mixtures instead of ATP. The generation of pyruvate obtained as result of the possible transfer of orthophosphate from PEP to ProTα was monitored by the PK assay using the NADH/LDH method (see below).

### 2.5. Purification of proteins with ProTαK activity

Cytosolic extracts from NC37 cells were loaded onto phosphocellulose columns (at a ratio of 10 mg of extract per milliliter of ion exchanger) previously equilibrated with buffer A, and, after washing with buffer A containing 0.1 M NaCl, ProTαK was eluted with 0.6 M NaCl. Fractions with ProTαK activity were dialyzed against buffer A containing 75 mM NaCl and purified by affinity chromatography on ProTα-Sepharose as previously described [24]. Briefly, 15 mg samples were purified by affinity chromatography using 1 ml of ProTα-bound Sepharose, and ProTαK activity was eluted using 1 M NaCl. Subsequent to elution, fractions with ProTαK activity were dialyzed against buffer A and concentrated to 1 mg/ml by centrifugation in Amicon concentrators (10,000 Da molecular weight cut-off).

Aliquots (200  $\mu$ g) of purified ProTαK were electrophoresed by SDS-PAGE (8% gels). After electrophoresis, separated proteins were renatured following the methods of Hutchcroft et al. [29] with slight modifications. Briefly, gels were washed twice (15 min each) with 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, and 0.005% Tween-20, and washed twice with kinase assay buffer. Gels were then cut into slices of approximately 2 mm. Each slice was minced, and proteins were eluted overnight at 4 °C in 50  $\mu$ l of kinase assay buffer. ProTαK activity was tested in the different extracts, separately or in combinations, with a focus on extracts from gel slices containing proteins ranging from 60–70 kDa.

Products in gel slices with maximal ProTαK activity were re-electrophoresed in SDS polyacrylamide gels. To do this, the gel slices were washed with H<sub>2</sub>O (15 min), minced, incubated with 2 $\times$  Laemmli sample buffer for 30 min at room temperature, and incubated for 10 min at 40 °C before separating by 8% SDS-PAGE. After electrophoresis, gels were silver stained using the Bio-Rad Silver Stain kit following the manufacturer's instructions, and stained bands were further analyzed by mass spectrometry.

### 2.6. Mass spectrometry

Stained protein bands separated by SDS-PAGE were excised from gels, digested with trypsin, and analyzed by MALDI-TOF/LS-ESI-IT



dynamic exclusion mass spectrometry in the Proteomics Service of the Severo Ochoa Centre for Molecular Biology (Universidad Autónoma, Madrid, Spain). ProTα phosphorylation sites were identified by spectrometric analysis from ProTα-derived tryptic peptides by linear Ion Traps-MS (LIT) using the Simple Ion Reaction (SIR) scanning mode, as per the manufacturer's instructions [30].

## 2.7. Purification of the M2 isoform with ProTαK and PK activities

Cytosolic extracts of NC37 cells were either directly chromatographed on ProTα-Sepharose columns as in Ref. [24] or fractionated with sequential ammonium sulfate (AS) precipitation (45–75% saturation) to obtain the 45% and 75% AS fractions (F45 AS and F75 AS, respectively) and then fractions subjected to ProTα-affinity chromatography as above. Aliquots of the different fractions were dialyzed against buffer A for subsequent ProTαK activity assays or against 10 mM potassium phosphate buffer pH 6 containing 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM β-mercaptoethanol and 0.2 mM FBP (buffer B) for PK activity assays.

Fractions with ProTαK activity separated by ProTα-affinity chromatography from the F45 AS were concentrated by centrifugation in Amicon concentrators (10,000 Da cut-off) and further purified by HPLC-ion exchange chromatography in the conditions previously described [24].

The PK in the F75 AS was further purified as described [28] by chromatography on phosphocellulose (equilibrated in buffer B) and elution with 70 mM potassium phosphate buffer pH 6 containing 0.2 mM FBP and 0.5 mM PEP.

Fractions of purified ProTαK and PK were separated by SDS-PAGE and blotted with anti-M2 (see Section 2.9) and the immunoreactive protein analyzed by mass-spectrometry as indicated above.

## 2.8. Affinity chromatography of rabbit muscle cytosolic extracts

Rabbit muscle cytosolic extracts were prepared as described [28]. Affinity chromatography on ProTα-Sepharose columns was carried out as in Ref. [24]. Aliquots of the different fractions were dialyzed to assay ProTαK and PK activities as indicated in Section 2.7.

## 2.9. Antibodies and immunologic assays

Goat antibodies against M1-PK were from Rockland (Gilbertsville, PA). The monoclonal antibody DF4 against M2-PK was from ScheBo Biotech (Giessen, Germany), and rabbit anti-c-myc epitope antibodies were from Sigma. Rabbit antibodies against ProTα were custom-produced and immunoaffinity-purified as described previously [18].

Immunodepletion and immune kinase assays of ProTαK activity were carried out using purified ProTαK from F45 AS (as indicated above). For immunodepletion assays [31], aliquots (50 µg) of ProTαK were incubated in kinase assay buffer (50 µl) with varying amounts of non-immune serum, anti-M1 serum, or anti-M2 antibodies. Mixtures were incubated for 4 h at 4 °C with gentle shaking. Then, 40 µl of Sepharose-bound protein A (for non-immune serum) or protein G (for anti-M1 serum and anti-M2 antibodies) was added, and the mixtures were shaken for another 2 h at 4 °C. Immunocomplexes were collected by centrifugation, and kinase activity in the supernatant was assayed after adding 100 µM [<sup>32</sup>P] ATP to the reaction mixture. For immunoprecipitation, purified ProTαK (300 µg) was diluted to 500 µl with immunoprecipitation buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 75 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 0.2% CHAPS, 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF and 1 µg/ml of leupeptin, pepstatin, and aprotinin), precleared with non-immune serum for 2 h at 4 °C, and incubated with 40 µl of anti-M1 or 5 µg of anti-M2 (previously coupled to 40 µl of protein G-Sepharose beads) for 4 h at 4 °C. Immunocomplexes were recovered by centrifugation and washed three times with immunoprecipitation buffer.

For immune kinase assays [32], aliquots from the immunoprecipitated material were further washed twice with kinase assay buffer, suspended in 35 µl of the same buffer, and kinase activity was assayed as described.

For Western blotting analyses, aliquots of the diverse cellular fractionates or immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE, and then subjected to Western blotting and proteins transferred to 0.22-µm nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell Bioscience) were incubated with primary antibodies. Immunoreactive proteins were detected using the ECL kit (GE Life Science) following the manufacturer's instructions.

Co-immunoprecipitation assays in NC37 cytosolic extracts (3 mg) were performed using anti-N-terminal or anti-C-terminal ProTα antibodies, and the immunocomplexes analyzed by Western blotting with anti-M2, in the conditions described above, or with anti-N-terminal ProTα antibodies using nitrocellulose membranes previously activated with glutaraldehyde as described [18]. Lysates from transfected 293T cells (1.5 mg) were immunoprecipitated with anti-c-myc epitope antibodies, and the immunocomplexes were analyzed by Western blotting with anti-M2 or anti-c-myc epitope (in the same conditions as described for N-terminal ProTα antibodies).

Quantification of the M2-immunoreactive protein in the diverse fractionates was deduced from densitometric analysis (Quantity One software from Bio-Rad) of the respective Western blots, referring the M2 concentration in these fractionates to the total M2 protein estimated from the respective inputs.

## 2.10. Pyruvate kinase activity assay

PK activity was determined using the NADH-LDH coupled method [28]. Reaction mixtures (1 ml) contained 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.1 M KCl, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM ADP, 2 mM PEP, 0.5 mM FBP, 0.18 mM β-NADH, and 8 U of L-LDH. Activity was calculated by monitoring reductions in absorbance at 340 nm. The effects of FBP, Mn<sup>2+</sup>, L-cysteine, L-alanine, and T3 on PK activity were assessed.

## 2.11. Phospho-amino acid analyses

Phospho-amino acid analyses of *in vivo* phosphorylated M2 protein were carried out as described [33]. Briefly, the M2 isoform of PK was purified from metabolically labeled NC37 cells (about 400 × 10<sup>6</sup> cpm) as described above, immunoprecipitated with anti-M2 antibodies, and the immunocomplexes were subjected to SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes and blotted with anti-M2. Bands containing immunoreactive M2 protein were detected by autoradiography, excised, boiled for 2 h in 200 µl of 6 N HCl at 110 °C and centrifuged. The supernatant was diluted with water and lyophilized. Dried pellets were resuspended in 10 µl of electrophoresis buffer (50:5:945 acetic acid/pyrimidine/water, pH 3.5) containing 0.5 mg/ml each of phosphoserine, phosphothreonine, and phosphotyrosine, and subjected to one-dimensional thin layer electrophoresis on cellulose plates (Merck) at 4 °C for 1 h at 1000 V. The plates were then dried, stained with ninhydrin, and autoradiographed for detection of <sup>32</sup>P-labeled amino acids.

## 2.12. Gel filtration

Components in the F45 AS (600 µg) and F75 AS (400 µg) from cytosolic extracts of NC37 cells, either untreated or treated with 5 mM FBP and/or alkaline phosphatase, were chromatographed on Superdex 200 10/300 GL columns (GE Life Sciences) in 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.18% CHAPS at a flow rate of 0.4 ml/min. Fractions were collected every minute, and ProTαK and PK activities in the individual fractions were assayed as indicated above. The presence of M2-immunoreactive proteins in the different fractions was determined by Western blotting.

### 2.13. Dephosphorylation assays

Dephosphorylation was carried out by incubation of components in the F45 AS and F75 AS fractions in the presence of biotinylated alkaline phosphatase at 0.1 U/μg in 50 mM Tris–HCl pH 7.9, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.1 mM ZnCl<sub>2</sub> for 30 min at 37°C. Alkaline phosphatase was depleted by incubation with streptavidin-agarose following the manufacturer's instructions.

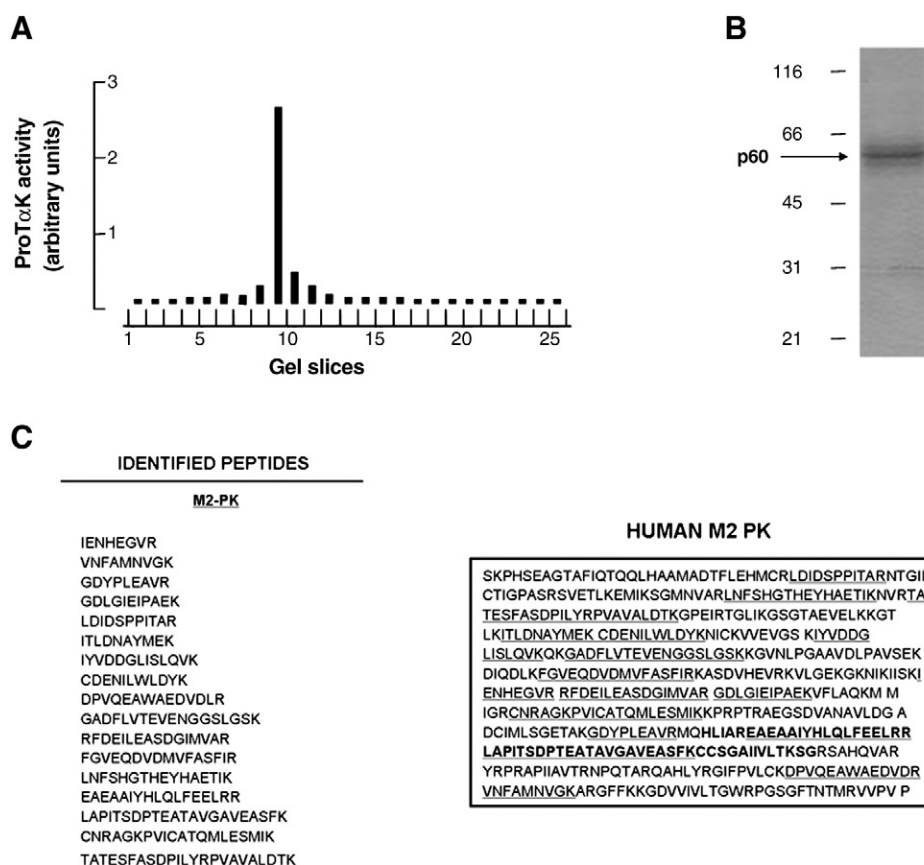
## 3. Results

### 3.1. Purification and structural characterization of ProTαK activity in NC37 lymphocytes

To purify and characterize the protein kinase responsible for the phosphorylation of ProTα (ProTαK) in proliferating cells, we used cytosolic extracts from transformed human B-lymphocytes (NC37 cells) in which high levels of ProTαK activity were previously found [24]. We designed a purification procedure to obtain large amounts of ProTαK (see [Materials and methods](#)) based on ion-exchange chromatography on a phosphocellulose column followed by ProTα affinity chromatography on a ProTα-Sepharose column. The chromatographically purified ProTαK was then separated by SDS-PAGE and the functionally active enzyme searched for in the renatured gel. For this, we used a modification of the gel renaturation technique [29], in which assays for ProTαK activity are performed in 2-mm slices of renatured gels. We have previously observed that ProTαK activity co-purifies together with

a protein(s) of 60 kDa [25], and this procedure allowed us to assay ProTαK activity not only in separate gel slices but also in various combinations of slices obtained from different positions in gels. This analysis indicated that ProTαK activity was exclusively present in the slice containing proteins ranging 60 kDa (Fig. 1A), and no variation in ProTαK activity was observed when this slice was combined with other slices (not shown). Separation of the components in the slice with the highest ProTαK activity by SDS-PAGE showed that it mainly contained a single protein (Fig. 1B). This protein was further analyzed by mass spectrometry (Supplementary Fig. 1), and the sequences of its tryptic peptides, shown in Fig. 1C, identified it as the M2-type isoenzyme of human PK (sequence inset in Fig. 1C). This identification is unexpected, since it indicates a novel catalytic behavior for this enzyme, i.e., as a protein kinase in addition to being part of the glycolytic pathway.

The M2 isoform is one of the four isoenzymes (L, R, M1, and M2) of PK in mammals, all of which are encoded by two different genes. Isoenzymes L and R are encoded by the gene PKL, while M1 and M2 are produced by alternative splicing from a common primary transcript of the gene PKM. The M2 isoform (inset in Fig. 1) differs from the M1 isoform by a segment of 56 amino acids, which is derived from alternative inclusion of exon 9 (M1) or 10 (M2) [34–37]. The special characteristics of the M2 isoform, being preferentially expressed in proliferating cells and in tumor cells, make its relationship with ProTαK feasible because this protein is essential for cell proliferation [3], and these are the conditions in which phosphorylation of ProTα takes place. This led us to further confirm the relationship between ProTαK and the M2 isoenzyme of PK.



**Fig. 1.** Structural characterization of the protein with ProTαK activity obtained from NC37 cell extracts. (A) SDS-PAGE separation and in-gel assay of ProTαK activity. Purified ProTαK was separated by SDS-PAGE. The gel was then renatured and sliced into 2-mm slices, and ProTαK activity was assayed in the slices as indicated in [Materials and methods](#) section. The amount of ProTαK activity in each slice is represented by the dark bars. (B) SDS-PAGE analysis of the gel slice with maximal ProTαK activity. Products in the gel slice were separated by SDS-PAGE, and the gel was stained with silver nitrate. The main band was then cut out, trypsin-digested, and the tryptic peptides were analyzed by mass spectrometry (Fig. S1). (C) The sequences of the peptides obtained by LS-ESI-IT are shown. The tryptic peptides identified are underlined in the human M2 sequence (inset), and the 56 amino acids from exon 10, which differentiate the M2 from the M1 isoenzyme, are shown in bold type.

### 3.2. Comparative study of ProTαK and PK activities in proliferating lymphocytes

In these experiments, we investigated the characteristics of ProTαK and PK activities in different cytosolic fractions from NC37 cells. Initially, and according to the demonstrated affinity of ProTαK for ProTα-bound Sepharose [24], we compared the affinity of both ProTαK and PK for ProTα in crude cytosolic extracts. These extracts were also used in parallel experiments to analyze the evolution of the M2-immunoreactive protein using an anti-M2 monoclonal antibody that exclusively recognizes the M2 isoform, as well as polyclonal anti-M1 antibodies that are immunoreactive against both the M1 and M2 isoforms. The results described in Fig. 2A indicate that fractions that showed affinity for ProTα retained ProTαK activity. Quantification of the M2-immunoreactive protein (see Materials and methods), either using anti-M1 or anti-M2 antibodies (Fig. 2A and B show the results using anti-M2 antibodies) indicated that most of this protein (about 90%) accompanied PK activity, while about 10% of this protein is retained by the ProTα-Sepharose together with ProTαK activity.

Next, we performed a similar analysis in the cytosolic fractions from NC37 cells obtained by sequential fractionation with ammonium sulfate (AS). As shown in Fig. 2B the ProTαK activity was separated in the 45% AS saturation fraction (F45 AS), and the PK activity was separated in the 75% AS saturation fraction (F75 AS). As also shown in Fig. 2B, the ProTαK and PK activities in the AS fractions maintained similar patterns in their affinities for ProTα as they did in the whole cytosolic extracts. The ProTαK activity in the F45 AS showed a strong affinity for ProTα, while the PK activity in the F75 AS did not interact with ProTα. According to the densitometric analyses of the Western blots in Fig. 2B, about 80% of the M2-immunoreactive protein (with low affinity for ProTα) was in the F75 AS together with the PK activity, while a 20% was in the F45 AS, with less than 10% shared with ProTαK its affinity for ProTα.

The ProTαK and PK activities were further purified from the respective AS fractions, according to the procedures indicated in Materials and methods. SDS-PAGE and Western blot analysis of the ProTαK and PK activity, respectively purified from the F45 AS and F75 AS, showed that the main protein co-eluting with both activities was immunoreactive to anti-M2 (data not shown). Analyses of the M2-immunoreactive protein by mass spectrometry (Supplementary

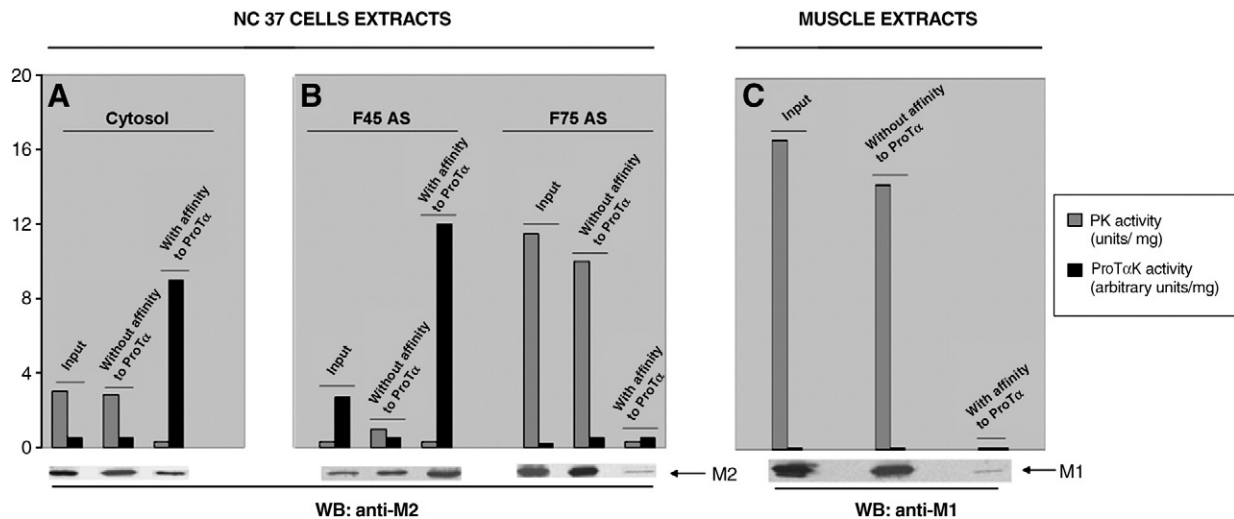
Figs. 2 and 3) indicate that protein co-purifying with both ProTαK and PK activities was the M2 isoform of PK.

To complete the study relating the PK isoforms to the ProTαK activity, we investigated the ability of the M1 isoform to interact with and to phosphorylate ProTα, using rabbit muscle extracts that exclusively contain the M1 isoform. Results in Fig. 2C indicated that the M1 isoform behaved as the M2 protein with PK activity in F75 AS: it has very low affinity for ProTα and no ProTαK activity. This inability of the M1 isoform to phosphorylate ProTα is in agreement with the fact that the concentration of ProTα in mammalian muscle is inappreciable [38].

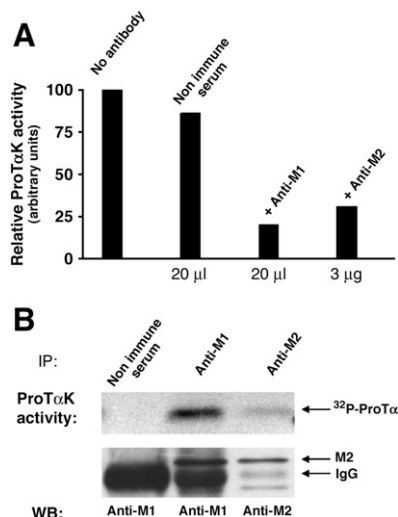
Then we carried out an immunological study of ProTαK in order to complete its characterization and to determine any specific interaction between ProTα and M2 protein in proliferating cells. As indicated in Fig. 3A, both anti-M1 and anti-M2 antibodies efficiently abolished ProTαK activity of the enzyme purified from the F45 AS of the NC37 cytosolic extract. Moreover, these antibodies were able to co-immunoprecipitate ProTαK activity and the M2 protein from fractions of the purified ProTαK (Fig. 3B). A similar immunological analysis of ProTαK purified from cytosolic extracts of murine splenocytes activated with ConA and IL-2 [24] demonstrated that ProTαK activity in these cells was also due to the M2 protein (data not shown).

To demonstrate the interaction between M2 and ProTα in proliferating cells, we performed co-immunoprecipitation experiments. Cytosolic extracts from NC37 cells were immunoprecipitated with anti-ProTα antibodies raised against epitopes included in segments of its sequence located either at the N- or C-terminus [18]. Analyses of the immunoprecipitated material indicated (Fig. 4A) that both anti-ProTα antibodies co-immunoprecipitate a complex of ProTα bound to the M2 protein. Co-immunoprecipitation experiments were also carried out in 293T cell lysates that were transfected with an expression vector harboring recombinant ProTα or transfected with the same empty vector. Analysis of the immunoprecipitated material obtained using antibodies against the c-myc-epitope corroborates the presence of the ProTα-M2 complex in 293T cells (Fig. 4B).

Although the low immunoreactivity of the ProTα antibodies [18] impeded a correct evaluation of the amounts of proteins that co-immunoprecipitate with ProTα, quantification of the co-immunoprecipitated M2 protein in Fig. 4 indicated that it comprised about 5–10%



**Fig. 2.** Comparative analysis of PK and ProTαK activities in NC37 and rabbit muscle cell extracts. Components from crude cytosol (A) or from the F45 AS or F75 AS (B) were affinity purified on ProTα-Sepharose columns. The ProTαK and PK activities were assayed in the fractions with and without affinity to ProTα. Aliquots (5 μg) of these fractions were also separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using anti-M2 antibodies. The input corresponds to a similar analysis of 10 μg of crude cytosol (panel A) or 7 μg of F45 AS and F75 AS (panel B). (C) Rabbit muscle cytosolic extracts were chromatographed on ProTα-Sepharose columns, and both ProTαK and PK activities were assayed in the fractions with and without affinity for ProTα. Aliquots (5 μg) of these fractions were analyzed by Western blotting using anti-M1 serum. The input corresponds to the Western blot analysis of 5 μg of rabbit muscle crude cytosolic extract. Results are representative of three independent experiments.



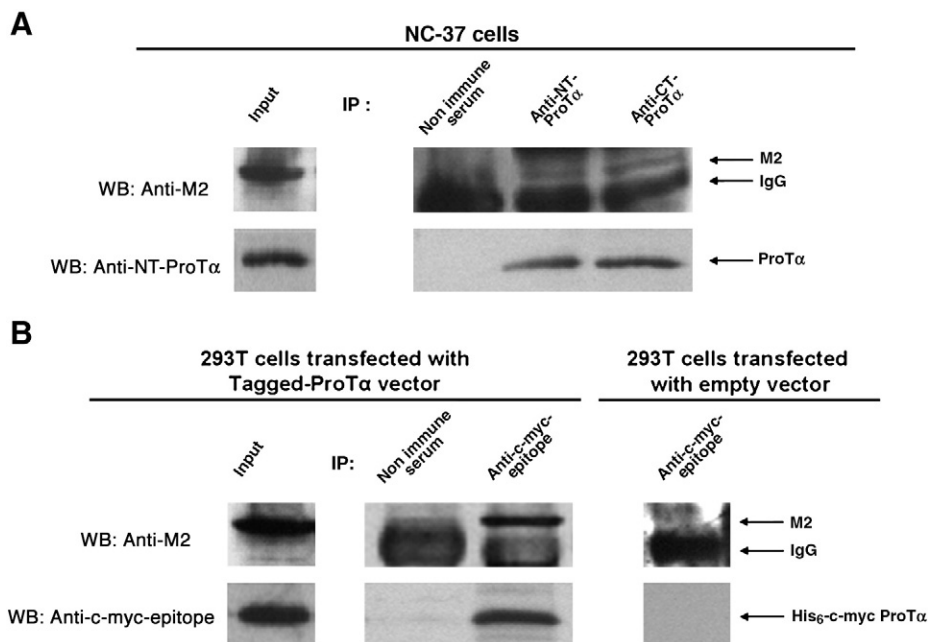
**Fig. 3.** Immunological characterization of ProTαK. (A) Immunodepletion of ProTαK activity with anti-M1 and anti-M2 antibodies. The activity of ProTαK purified from the F45 AS of cytosolic extracts of NC37 cells as indicated in [Materials and methods](#) was assayed in the absence or presence of the indicated amount of non-immune serum, anti-M1 serum, or an anti-M2 monoclonal antibody. Bars indicate kinase activities expressed as percentages of ProTαK activity in the absence of antibody. Data are representative of three similar experiments differing by less than 20%. (B) Immunoprecipitation of ProTαK by anti-PK antibodies. ProTαK purified as in panel A was immunoprecipitated with 20 μl of non-immune serum, 20 μl of anti-M1 serum, or 5 μg of anti-M2. ProTαK activity, as well as the presence of M2 protein, was determined in each of the immunocomplexes. ProTαK activity (upper row) corresponds to the  $^{32}\text{P}$ -ProTαK detected by autoradiography in the respective reaction mixtures separated by SDS-PAGE. Aliquots from immunoprecipitated complexes were also separated in parallel by SDS-PAGE and detected by Western blotting using anti-M1 or anti-M2 antibodies. The positions of the M1 and M2 immune-reactive proteins are indicated above the immunoglobulin band (bottom of the panel). Results are representative of three independent experiments.

of total cytosolic M2. This percentage agrees with the observed *in vitro* interaction of M2 with ProTα-Sepharese.

We next investigated whether the catalytic activity of the M2-ProTαK seen *in vitro* corresponds to that found *in vivo*. To this end, we analyzed by mass spectrometry the phosphorylation sites of ProTα phosphorylated with M2-ProTαK and compared them with the phosphorylation sites of ProTα isolated from NC37 cells. Results of these analyses ([Supplementary Fig. 4](#)) showed that in both cases, ProTα is phosphorylated at the threonine residue located at position 7, as marked on the human ProTα sequence in [Fig. 5A](#). This phosphorylation site coincides with that seen by us in normal murine splenic lymphocytes, although in these cells (activated with ConA plus IL-2), threonine residues located at position 12 or 13 are also phosphorylated *in vivo* and *in vitro* by murine ProTαK [24].

To confirm the phosphorylation of threonine 7, we generated a mutant from recombinant tagged ProTα in which this amino acid was substituted for alanine. Vectors harboring T7A ProTα and non-mutated recombinant ProTα were transfected into 293T cells, and cells labeled with  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate. Incorporation of  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate into recombinant ProTα expressed in the 293T cells was determined in the immunoprecipitates from the lysates of the transfected cells. As shown in [Fig. 5B](#), only wild-type ProTα was phosphorylated, while mutant ProTα showed no  $^{32}\text{P}$ -incorporation, confirming that threonine 7 is also the phosphorylation site of ProTα in these tumor cells.

To conclude our comparative study of ProTαK and PK activities, we investigated the effects of FBP, the cations  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$ , the amino acids cysteine and alanine, on both ProTαK and PK activities purified from the F45 AS and F75 AS. These effectors have previously been shown to modify PK activity [28,39,40]. Results in [Fig. 6](#) show that there are differences in the responses of the two enzymatic activities to some effectors. While FBP is essential for PK activity (note that standard conditions used to evaluate PK activity include FBP), ProTαK activity is almost unaffected by this molecule. Both enzymes were  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$ -dependent, and the latter had a strong activating effect on both enzymatic activities over a wide range of



**Fig. 4.** Interaction of ProTα and M2 in NC37 and 293T cells. (A) Co-immunoprecipitation of ProTα and M2 protein in NC37 cells. The M2 protein was immunoprecipitated from cytosolic extracts with 20 μl of non-immune serum, or with 20 μg each of anti-N-terminal (anti-NT) or anti-C-terminal (anti-CT) ProTα antibodies. Aliquots of the immunoprecipitated materials were separated by SDS-PAGE and blotted with anti-M2 (upper row) or with anti-NT ProTα (bottom row) antibodies. The input corresponds to an immunoblot analysis of 40 μg of crude cytosolic NC37 extract blotted with anti-M2 or anti-NT ProTα. (B) Co-immunoprecipitation of recombinant ProTα and M2 protein in 293T cells. Lysates of 293T cells transfected either with a vector expressing His<sub>6</sub>-c-myc double-tagged ProTα or with empty vector were immunoprecipitated with 20 μl of non-immune serum or 8.5 μg of anti-c-myc epitope antibody. The immunoprecipitated material was separated by SDS-PAGE and blotted with anti-M2 or anti-c-myc epitope antibodies. The input corresponds to the immunoblot analysis of 40 μg of crude lysate of 293T cells blotted with anti-M2 or anti-c-myc epitope antibodies.

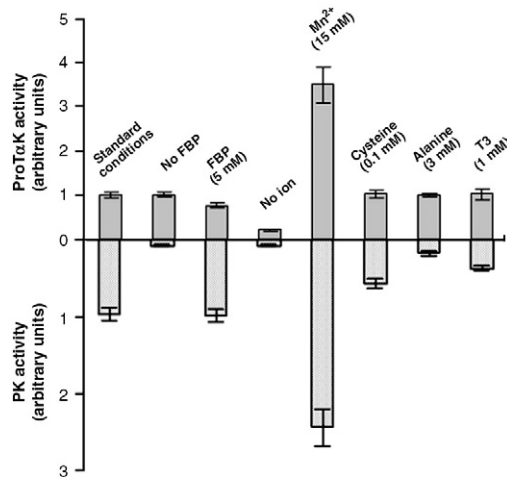




**Fig. 5.** Study of the phosphorylation sites of ProTα *in vivo* and *in vitro*. (A) Sequence of human ProTα, showing the site at which ProTα is phosphorylated in NC37 cells and by the M2-ProTαK from NC37 cells (solid arrow). (B) Phosphorylation of recombinant ProTα in 293T cells. These cells, transfected either with a vector expressing wild-type tagged-ProTα, T7A-tagged-ProTα or empty vector, were metabolically labeled with <sup>32</sup>P-orthophosphate. Recombinant ProTα was immunoprecipitated from cell lysates with anti-c-myc epitope antibodies, separated by SDS-PAGE and <sup>32</sup>P-ProTα detected by autoradiography (upper row). Aliquots from immunoprecipitated complexes were also separated in parallel and blotted to determine the presence of recombinant ProTα (bottom row).

concentrations. Likewise, cysteine and alanine had an inhibitory effect on PK but not on ProTαK. Fig. 6 shows the maximal effects of all these effectors on ProTαK and PK activities at the concentrations indicated.

Given that it has been reported that in mammalian cells a monomer of M2 isoform functions as a T3-binding protein in a process regulated by FBP [41], we investigated whether this protein could be related to M2-ProTαK. Specifically, we carried out a comparative analysis of the ability of T3 to affect M2-ProTαK activity at a concentration that has been shown to inhibit M2-PK activity [41]. The results of these experiments, also shown in Fig. 6, indicate that, while T3 inhibits M2-PK activity, it did not affect M2-ProTαK activity, which suggests an exclusive affinity of T3 for the M2-PK protein. We also assayed the effect of PEP on ProTαK activity, and we found that this metabolite did not affect ProTαK activity. Moreover, PEP was unable to replace ATP for transfer of orthophosphate to ProTα; this was demonstrated by the lack of pyruvate generation (as described in Materials and methods) in a reaction mixture containing M2-ProTαK, ProTα, and PEP instead of ATP.



**Fig. 6.** Comparative study of the influence of effectors on the M2-ProTαK and M2-PK activities. Enzymatic activities were assayed with ProTαK and PK, purified as indicated in Materials and methods, in the absence or presence of different concentrations of diverse effectors. Bars are representative of activities under standard conditions (corresponding to kinase and PK buffer assays described in Materials and methods), and of the maximal effects on activity of each effector at the indicated concentration. Error bars indicate  $\pm$  SD of four independent experiments.

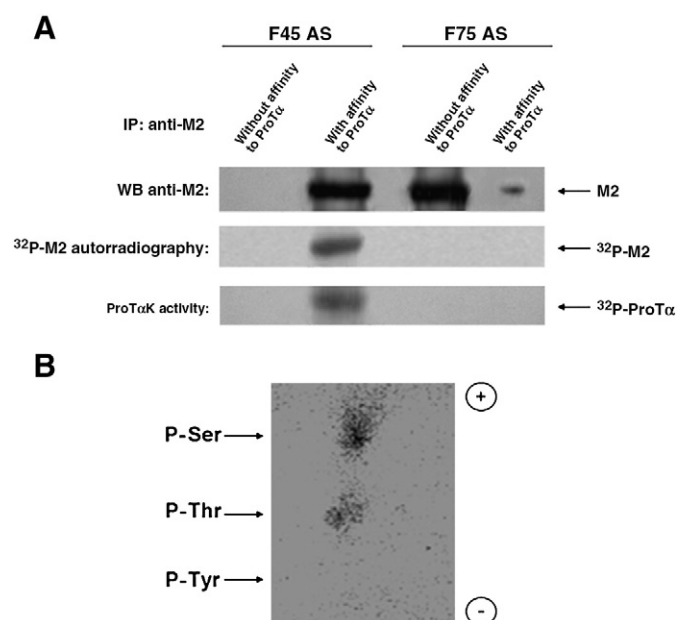
Judging from the results of the comparative study of the ProTαK and PK activities, ProTαK activity seems to correspond with a small part (about 10%) of the cellular pool of the M2 protein, the portion that specifically interacts with ProTα in NC37 and 293T cells. This portion of the M2 protein displays no observable PK activity and shows important enzymatic differences with the main cellular contents of the M2 isoform with PK activity. Moreover, it can be inferred from this study that small differences in the structure of M2 isoform, specifically those related to its affinity for ProTα, seem to be responsible for the differential behaviors observed in the M2 protein with ProTαK and PK activity.

### 3.3. Study of the dual functionality of the M2 isoform of PK

Our next step was, therefore, to elucidate the structural characteristics that could induce the observed partitioning and dual functionality of the M2 cellular pool. Since we have found that ProTαK activity is dependent on a phosphorylation process also related to cell proliferation [25] and that modifications in the quaternary structure of the M2 isoenzyme have been reported to influence the PK activity of the M2 isoform [42], we attempted to determine if these processes might be involved in the observed dual functionality of the M2 isoform.

First, we carried out experiments that were aimed at determining the influence that a phosphorylation process may have on the dual functionality of the M2 protein. To this end, NC37 cells were metabolically labeled with <sup>32</sup>P-orthophosphate, and its incorporation into the M2 protein was investigated in the components in the F45 and F75 AS that were separated by affinity to ProTα and immunoprecipitated with anti-M2. The results in Fig. 7A indicated that although the concentration of the M2 protein in the diverse fractions was similar to that found in Fig. 2B, the amount of <sup>32</sup>P-phosphorylated M2 protein corresponds exclusively with the M2 with ProTαK activity present in the F45 AS. Phospho-amino acid analysis of <sup>32</sup>P-phosphorylated M2 protein (Fig. 7B) indicates that serine and threonine residues are phosphorylated in NC37 cells, with a predominant phosphorylation of the serine residues.

When we tried to characterize the M2 isoform phosphorylation sites, we failed in the identification of the phospho-peptides in the mass spectrometry analyses of the M2 protein with ProTαK activity. This could be because some peptides were missing among those derived from the M2 isoform sequence. Therefore, a new approach will need to be attempted in the future.



**Fig. 7.** Study of the phosphorylation of the M2 protein. (A) Influence of M2 phosphorylation on its affinity to ProTx-bound Sepharose and on its ProTxK activity. Lysates of NC37 cells metabolically labeled with  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate were sequentially precipitated with ammonium sulfate (45% and 75%) and chromatographed on ProTx-Sepharose. Components in different fractionates were immunoprecipitated with anti-M2 monoclonal antibody, and aliquots of the diverse immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE, blotted to determine the presence of M2 (upper row) and autoradiographed to see  $^{32}\text{P}$ -phosphorylated M2 (middle row), or used to assay the ProTxK activity (bottom row). (B) Phosphoamino acid analysis of  $^{32}\text{P}$ -phosphorylated M2 protein. Phosphoamino acid analysis of the  $^{32}\text{P}$ -M2 immunoprecipitated from F45 AS fraction separated by affinity to ProTx-Sepharose was carried out as described in [Materials and methods](#). The arrows indicate the migration of unlabeled phosphoserine (P-Ser), phosphothreonine (P-Thr), and phosphotyrosine (P-Tyr) detected using ninhydrin stain.

We next investigated the possible relationship between the quaternary structure of the M2 protein and its dual functionality. To do this, the quaternary structures of ProTxK and PK in F45 and F75 AS were analyzed by gel filtration without any prior treatment or with molecules/treatments that have been shown to have a significant effect on the following activities: FBP, known to affect PK activity, and dephosphorylation, reported to abolish ProTxK activity [25]. In untreated F45 AS, the M2 protein and ProTxK activity co-eluted, mainly around 180 kDa, and with a smaller proportion in a common peak around 60 kDa with lower ProTxK activity (Fig. 8A). This elution pattern, corresponding to the distribution of the immunoreactive M2 protein, probably corresponds to the trimeric and monomeric forms of the M2 protein, respectively, and is similar to that observed for ProTxK activity isolated from normal murine proliferating lymphocytes [24]. As also shown in Fig. 8A, incubation of the F45 AS with FBP induced an apparent tetrameric association of M2 protein that resulted in a small decrease in its ProTxK activity, as previously observed in Fig. 6. When components in this fraction were treated with alkaline phosphatase, the ProTxK activity of the M2 protein was abolished, in agreement with our previous results [25], and it eluted as a monomer (Fig. 8A). Furthermore, incubation of this phosphatase-treated fraction with FBP (after removing the phosphatase activity, as indicated in [Materials and methods](#)) did not promote aggregation of M2 since elution of M2 was similar to that of the phosphatase-treated ProTxK in F45 AS shown in Fig. 8A. In contrast, the M2 protein from the untreated F75 AS did not show PK activity and eluted in the monomeric form (Fig. 8B). Incubation of the F75 AS with FBP restored the PK activity, and the highest levels of PK activity co-eluted with tetrameric aggregates of M2 protein, while a lower PK activity peak was associated with dimeric M2-PK (Fig. 8B). The behavior of the PK

activity is in agreement with that described for M2-PK in proliferating cells [42]. Treatment with phosphatase did not cause appreciable alterations in the pattern of elution of M2-PK activity, whether with or without further incubation with FBP (the elution pattern of M2-PK activity after incubation of the fraction with FBP is shown in Fig. 8B).

In accordance with these results, phosphorylation of a small part (about 10%) of the cellular pool of the M2-type PK in serine and threonine residues seems to be essential for inducing its ProTxK activity. This phosphorylation also enables quaternary or ternary associations of the M2-ProTxK that favor a higher activity than that shown for the monomeric form of the phosphorylated M2-ProTxK. However, it cannot be ruled out that other effectors, such as FBP, could also cooperate in the oligomeric association of M2 to increase the activity of monomeric M2-ProTxK.

#### 4. Discussion

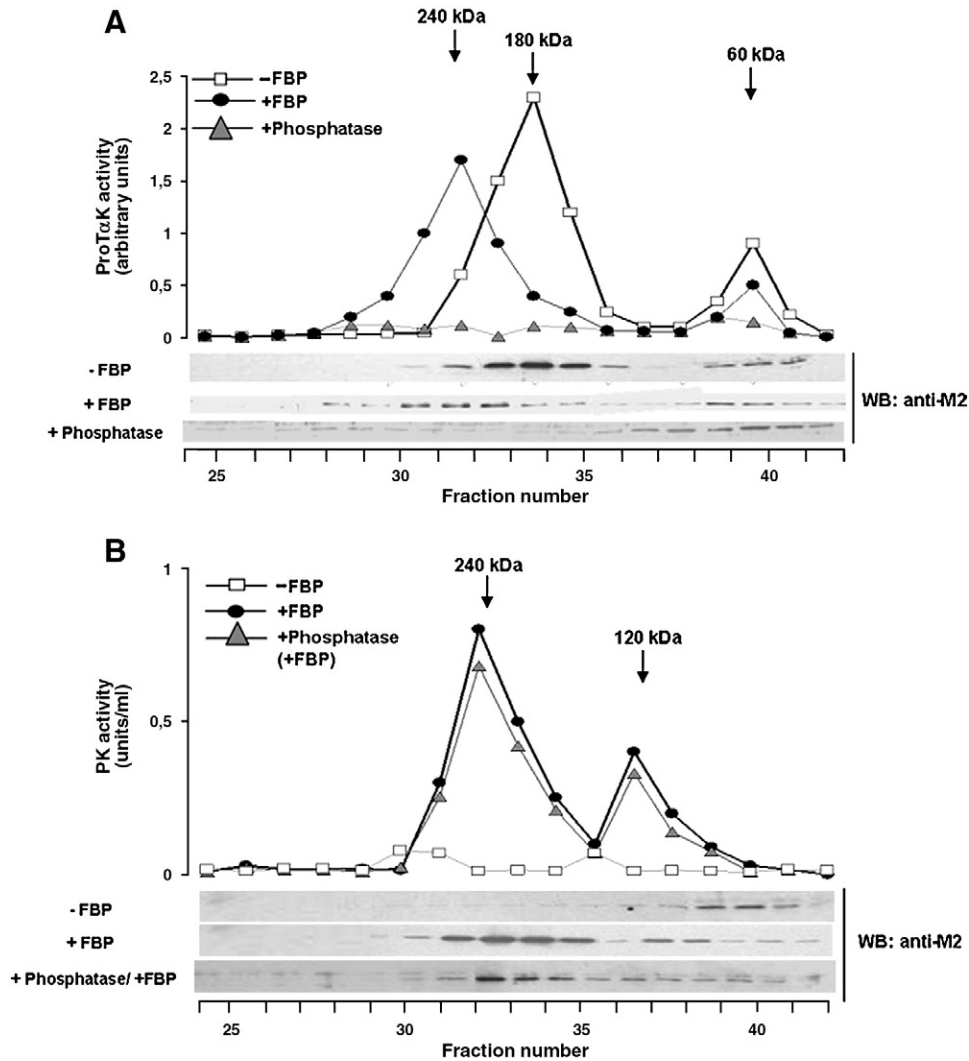
The data presented here provide evidence of a novel property of PK. Specifically, our results indicate that the PK isoenzyme M2 is enzymatically bifunctional, showing both glycolytic and protein kinase functions. In other words, the previously characterized function of this protein, to couple the free energy of PEP hydrolysis to the synthesis of ATP to form pyruvate, is modified to a totally different enzymatic activity, with the usual substrates PEP and ADP replaced by ATP and ProTx, so that it also functions as a protein kinase. However, this newly described ability is displayed by only a small proportion of the total pool of M2, the main PK isoform in proliferating cells [36,37,39,42].

The novel ability of the M2 isoform reported here is to be added to the other two biological functions so far described for this protein. The principal function is as PK, meeting the high demand for glycolytic activity in proliferating cells [42]. The second function for the M2 isoform is in the monomeric form, as a T3-binding protein [41].

According to the properties of ProTxK described here as well as those that have been previously demonstrated [24,25], it is probable that the ProTxK activity in the M2 protein may occur in any proliferating mammalian cell. However, specificity of the M2-ProTxK could differ depending on the cellular origin of this enzyme. Thus, ProTxK from normal murine lymphocytes phosphorylates not only threonine 7 but also threonine residues at position 12 or 13 [24], while ProTxK from tumor cells phosphorylates only threonine 7 (present results).

Our study demonstrates that phosphorylation of M2 at specific sites in serine and threonine residues is responsible for conferring ProTxK activity to less than 10% of the cellular pool of the M2 protein. This proportion is in agreement with the level of the M2 protein that has been reported to be phosphorylated in proliferating cells [42]; it is also in agreement with the amount of ProTx that is phosphorylated in proliferating lymphocytes (18% of the cellular pool of ProTx) [24].

Phosphorylation of the diverse isoenzymes of PK has been widely described [42,43], and although in the case of the liver L isotype it has been shown to control PK activity in this tissue [43,44], in the case of M2 isoform, the biological significance was, up to now, controversial [42]. The M2 protein appears to be the substrate for protein kinases that, in normal cells, phosphorylate M2 at only serine and threonine residues, while in tumor cells, tyrosine residues were also phosphorylated [45,46]. Yet, the characteristics of the M2 phosphorylation that we found in NC37 cells differ from those that have been previously reported. Thus, we did not find any phosphorylated tyrosine residues in the M2 protein from the tumor lymphocytes, and the phosphorylation conferring ProTxK activity to M2 results in important differences in the behavior of the transformed M2 pool, including a specific quaternary structure and a spectacular change in its active site, affecting both its substrate/co-substrate affinities and its response to typical effectors of PK. Although the M2-ProTxK maintains a certain affinity for FBP, the effect of this metabolite on



**Fig. 8.** Analysis of the influences of phosphorylation and FBP on the quaternary structures and activities of ProTαK and PK. Gel filtration of the components in the F45 and F75 AS was carried out in Superdex 200 columns (GL 10/300) at a flow rate of 0.4 ml/min, with fractions collected every minute. (A) The effects of phosphatase and FBP treatment on ProTαK in the F45 AS. Components in the F45 AS, either untreated or incubated with FBP or phosphatase, were loaded onto gel filtration columns, and ProTαK activity and M2 protein levels were evaluated in each fraction as in Fig. 2. (B) The effect of phosphatase and FBP treatment on PK in the F75 AS. Components of the F75 AS that were either untreated, treated with FBP, or treated with phosphatase and then with FBP, were loaded onto gel filtration columns, and both PK activity and M2 protein levels were evaluated in each fraction as above.

the modified M2 isoform was quite different from its effect on the M2-PK (see Fig. 6). In view of the low influence of FBP on ProTαK activity, it seems improbable that FBP regulates ProTαK *in vivo*, as it does with PK activity [39]. Other effectors influencing the phosphorylation and/or the quaternary structure of M2-ProTαK may be *in vivo* regulators of its activity.

Concerning the protein kinase that could be responsible for the phosphorylation that induces the ProTαK activity of the M2 protein, two protein kinases, the pp60<sup>src</sup> [47] and the δPKC [48], have been reported to phosphorylate the M2 isoform in proliferating cells *in vivo* and *in vitro*. However, the properties induced by phosphorylation of M2 by these enzymes do not correspond to those found by us for M2-ProTαK. Specifically, phosphorylation of M2 by pp60<sup>src</sup> induces displacement of tetrameric forms of M2 to dimeric forms, which results in a decrease in its PK activity and which can be restored by incubation with FBP [42]. A similar effect was not observed for the M2-ProTαK. Furthermore, since phosphorylation by δPKC does not alter the PK activity of M2, this enzyme does not seem to be the candidate for promoting the ProTαK activity of M2. In fact, it has been suggested that phosphorylation of M2 by δPKC could be a step in its proteolytic degradation [48]. Therefore, it seems probable that some

other protein kinase is responsible for the induction of M2 ProTαK activity in the cellular M2 pool. Along these lines, we have found that the promotion of ProTαK activity in murine splenic proliferating lymphocytes is a PKC-dependent process (PKC by itself did not phosphorylate ProTα [25]). The recently reported ability of the M2 protein to bind phospho-tyrosine peptides, which affects the PK activity [49], provides evidence for the availability of this protein to be a substrate for protein kinases that are activated by tyrosine phosphorylation. Future characterization of the enzyme that is involved in the promotion of M2-ProTαK activity, as well as the phosphorylation sites on M2, will contribute to clarify the mechanism of this process. In this sense, we have failed in an attempt to reproduce the ProTαK activity *in vitro*, using cytosolic extracts of NC37 cells and a purified dephosphorylated M2 protein from these cells (data not shown).

A question of particular interest is, why is ProTαK activity shown by M2. It should be noted that we have found one enzyme, CK-2, that is able to phosphorylate ProTα *in vitro* [23]. In fact, the ProTα phosphorylation sites correspond to CK-2 motifs; however, the ProTα sites phosphorylated by CK-2, as well as the different properties of this enzyme with respect to ProTαK, ruled out its involvement *in vivo*, at least in normal lymphocytes [23]. According to the thus far attributed



biological roles of these proteins, several arguments can be brought forward to explain the relationship between ProTα and M2. One might be the coincidence of M2 expression [34,36,37] and the rise of ProTαK activity with the proliferation activity of the cells [24]. Another, which is more speculative, comes from a common anti-apoptotic effect of M2 and ProTα in proliferating cells. Thus, the control of the glycolytic flux exerted by the M2 isoform in proliferating cells [42], which induces a decrease in oxidative phosphorylation, and in the reactive oxygen species and cytochrome c levels, would promote an anti-apoptotic effect that might be related to that described for ProTα [19]. As such, the phosphorylation of ProTα by ProTαK might affect its involvement in the apoptosome. Thus, a common involvement of ProTα and M2 in proliferation might also promote another essential function that allows the cell cycle to progress: the avoidance of apoptosis.

The biological significance of ProTα phosphorylation remains unsolved. In this sense, we have found that ProTα phosphorylation does not affect its interaction with histones and other nuclear proteins involved in the nuclear function of ProTα [18,27]. Moreover, recent experiments using ProTα that has been mutated at its phosphorylation sites (unpublished results) indicated that phosphorylation has no influence on the nuclear import of ProTα. As a result, the importance of the ProTα phosphorylation process, whether in ProTα nuclear or cytoplasmic events (such as chromatin activity, processing to thymosin α<sub>1</sub>, or apoptosis), merits further research.

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.bbapap.2010.10.004.

## Acknowledgments

This work was supported by Dirección General de Investigación Grant BFU 2004-02523 from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia. We thank the research technician, Juan Muras, for his technical assistance with massive cell culture and extracts preparation.

## References

- [1] A.A. Haritos, O. Tsolas, B.L. Horecker, Distribution of prothymosin α in rat tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 1391–1393.
- [2] F.J. Franco, C. Díaz, M. Barcia, M. Freire, Thymosin α<sub>1</sub> is a native peptide in several tissues, *Biochim. Biophys. Acta* 1120 (1992) 43–48.
- [3] M. Freire, C. Díaz-Jullien, G. Covelo, Developments in prothymosin α research, In *Recent Res. Devel. Proteins. Transworld Res. Netw.* 1 (2002) 257–276.
- [4] S. Frilingos, M. Frangou-Lazaridis, K. Seferiadis, J.D. Hulmes, Y.C. Pan, O. Tsolas, Isolation and partial sequence of goat spleen prothymosin α, *Mol. Cell. Biochem.* 108 (1991) 85–94.
- [5] Y.P. Rubtsov, A.S. Zolotukhin, I.A. Vorobjev, N.V. Chichkova, N.A. Pavlov, E.M. Karger, A.G. Evstafieva, B.K. Felber, A.B. Vartapetian, Mutational analysis of human prothymosin α reveals a bipartite nuclear localization signal, *FEBS Lett.* 413 (1997) 135–141.
- [6] M. Freire, O. Crivellaro, C. Isaacs, S. Moschera, B.L. Horecker, Translation of mRNA from calf thymus in the wheat germ system: evidence for a precursor of thymosin α<sub>1</sub>, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 6007–6011.
- [7] A.R. Sbulati, R.E. Manrow, S.L. Berger, Prothymosin α antisense oligomers inhibit myeloma cell division, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 253–257.
- [8] W.H. Eschenfeldt, S.L. Berger, The human prothymosin α gene is polymorphic and induced upon growth stimulation: evidence using a cloned cDNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 9403–9407.
- [9] J. Gómez-Márquez, F. Segade, M. Dosil, J.G. Pichel, X.R. Bustelo, M. Freire, The expression of prothymosin α gene in T lymphocytes and leukemic lymphoid cells is tied to lymphocyte proliferation, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 8451–8454.
- [10] X.R. Bustelo, A. Otero, J. Gómez-Márquez, M. Freire, Expression of the rat prothymosin α gene during T-lymphocyte proliferation and liver regeneration, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 1443–1447.
- [11] M.A. Cotter, E.S. Robertson, Modulation of histone acetyltransferase activity through interaction of Epstein-Barr nuclear antigen 3C with prothymosin α, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 5722–5735.
- [12] C. Subramanian, S. Hasan, M. Rowe, M. Hottiger, R. Orre, E.S. Robertson, Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and prothymosin α interact with the p300 transcriptional coactivator at the CH1 and CH3/HAT domains and cooperate in regulation of transcription and histone acetylation, *J. Virol.* 76 (2002) 4699–4708.
- [13] Z. Karetsov, A. Kretsovali, C. Murphy, O. Tsolas, T. Papamarcaki, Prothymosin α interacts with the CREB-binding protein and potentiates transcription, *EMBO Rep.* 3 (2002) 361–366.
- [14] P.G. Martini, R. Delage-Mourroux, D.M. Kraichely, B.S. Katzenellenbogen, Prothymosin α selectively enhances estrogen receptor transcriptional activity by interacting with a repressor of estrogen receptor activity, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 6224–6232.
- [15] C. Díaz-Jullien, A. Pérez-Estévez, G. Covelo, M. Freire, Prothymosin α modulates the interaction of histone H1 with chromatin, *Biochim. Biophys. Acta* 1296 (1996) 219–227.
- [16] Z. Karetsov, R. Sandaltzopoulos, M. Frangou-Lazaridis, C.-Y. Lai, O. Tsolas, P.B. Becker, T. Papamarcaki, Prothymosin α modulates the interaction of histone H1 with chromatin, *Nucleic Acid Res.* 26 (1998) 3111–3118.
- [17] J. Gómez-Márquez, P. Rodríguez, Prothymosin α is a chromatin-remodelling protein in mammalian cells, *Biochem. J.* 333 (1998) 1–3.
- [18] G. Covelo, C.S. Sarandeses, C. Díaz-Jullien, M. Freire, Prothymosin α interacts with free core histones in the nucleus of dividing cells, *J. Biochem.* 140 (2006) 627–637.
- [19] X. Jiang, H.-E. Kim, H. Shu, Y. Zhao, H. Zhang, J. Kofron, J. Donnelly, D. Burns, S.-C. Ng, S. Rosenberg, X. Wang, Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin α in a death regulatory pathway, *Science* 299 (2003) 223–226.
- [20] C. Malicet, V. Giroux, S. Vasseur, J.C. Dagorn, J.L. Neira, J.L. Iovanna, Regulation of apoptosis by the p8/prothymosin α complex, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (2006) 2671–2676.
- [21] C.S. Sarandeses, G. Covelo, C. Díaz-Jullien, M. Freire, Prothymosin α is processed to thymosin α<sub>1</sub> and thymosin α<sub>11</sub> by a lysosomal asparaginyl endopeptidase, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 13286–13293.
- [22] M.G. Barcia, J.M. Castro, C.D. Jullien, M. Freire, Prothymosin α is phosphorylated in proliferating stimulated cells, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 4704–4708.
- [23] M.G. Barcia, M.G. Castro, C.D. Jullien, C. González, M. Freire, Prothymosin α is phosphorylated by casein kinase-2, *FEBS Lett.* 312 (1992) 152–156.
- [24] A. Pérez-Estévez, C. Díaz-Jullien, G. Covelo, M.T. Salgueiro, M. Freire, A 180-kDa protein kinase seems to be responsible for the phosphorylation of prothymosin α observed in proliferating cells, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 10506–10513.
- [25] A. Pérez-Estévez, J. Freire, C. Sarandeses, G. Covelo, C. Díaz-Jullien, M. Freire, Properties of the protein kinase that phosphorylates prothymosin α, *Mol. Cell. Biochem.* 208 (2000) 111–118.
- [26] F.J. Franco, C. Díaz, M. Barcia, M. Freire, Thymosin α<sub>1</sub> is a native peptide in several tissues, *Biochim. Biophys. Acta* 1120 (1992) 43–48.
- [27] J. Freire, G. Covelo, C.S. Sarandeses, C. Díaz-Jullien, M. Freire, Prothymosin alpha interacts with free histones in the nucleus of dividing cells, *Biochem. Cell Biol.* 79 (2001) 123–130.
- [28] K. Imamura, T. Tanaka, Methods in Enzymology, in: N.P. Kaplan, N.P. Colowick, W.A. Wood (Eds.), *Pyruvate kinase isozymes from rat*, Vol. 90, Academic Press, San Diego, 1982, pp. 150–164.
- [29] J.E. Hutchcroft, M. Anostarios Jr., M.L. Harrison, R.L. Geahlen, Methods in Enzymology, in: J.N. Abelson, M.I. Simon (Eds.), *Renaturation and assay of protein kinases after electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels*, Vol. 200, Academic Press, San Diego, 1991, pp. 417–423.
- [30] M. Villar, I. Ortega-Pérez, F. Were, E. Cano, J.M. Redondo, J. Vázquez, Systematic characterization of phosphorylation sites in NFATc2 by linear ion trap mass spectrometry, *Proteomics* 6 (2006) S16–S27.
- [31] A. Kishimoto, N. Saito, K. Ogita, Methods in enzymology, in: J.N. Abelson, M.I. Simon (Eds.), *Preparation and Use of Isozyme-Specific Anti Protein Kinase C Antibodies*, Vol. 200, Academic Press, San Diego, 1991, pp. 447–454.
- [32] S.R.S. Mullapudi, F. Ali-Osman, J. Shou, K.S. Srivenugopal, DNA repair protein o-alkylguanine-DNA alkyltransferase is phosphorylated by two distinct and novel protein kinases in human brain tumor cells, *Biochem. J.* 351 (2000) 393–402.
- [33] P. Van der Geer, K. Luo, B.M. Sefton, T. Hunter, Protein phosphorylation, in: D.G. Hardie (Ed.), *Phosphopeptide Mapping and Phosphoaminoacid Analysis on Cellulose Thin-Layer Plates*, IRL Press, Oxford, 1993, pp. 31–59.
- [34] T. Noguchi, H. Inoue, T. Tanaka, The M<sub>1</sub>- and M<sub>2</sub>-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 13807–13812.
- [35] M. Takenaka, T. Noguchi, S. Sadahiro, H. Hirai, K. Yamada, T. Matsuda, E. Imai, T. Tanaka, Isolation and characterization of the human pyruvate kinase M gene, *Eur. J. Biochem.* 198 (1991) 101–106.
- [36] C.V. Clover, D. Chatterjee, Z. Wang, L.C. Cantley, M.G. Vander Heiden, A.R. Krainer, The alternative splicing repressors hnRNP A1/A2 and PTB influence pyruvate kinase isoform expression and cell metabolism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107 (2010) 1894–1899.
- [37] C.J. David, M. Chen, M. Assanah, P. Canoll, J.L. Manley, HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer, *Nature* 463 (2010) 364–368.
- [38] M. Clinton, M. Frangou-Lazaridis, C. Panneerselvam, B.L. Horecker, Prothymosin alpha and parathymosin: mRNA and polypeptide levels in rodent tissues, *Arch. Biochem. Biophys.* 269 (1989) 256–263.
- [39] E.M. Muñoz, E. Ponce, Pyruvate kinase: current status of regulatory and functional properties, *Comp. Biochem. Physiol. B* 135 (2003) 197–218.
- [40] J. Ignacak, M.B. Stachurska, The dual activity of pyruvate kinase type M<sub>2</sub> from chromatin extracts of neoplastic cells, *Comp. Biochem. Physiol. B* 134 (2003) 425–433.
- [41] H. Kato, T. Fukuda, C. Parkison, P. McPhie, S.-Y. Cheng, Cytosolic thyroid hormone-binding protein is a monomer of pyruvate kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 7861–7865.
- [42] E. Eigenbrodt, M. Reinacher, U. Scheefers-Borchel, H. Scheefers, R. Friis, Double role for pyruvate kinase type M<sub>2</sub> in the expansion of phosphometabolite pools found in tumor cells, *Crit. Rev. Oncog.* 3 (1992) 91–115.
- [43] M.R. El-Maghrabi, W.S. Haston, D.A. Flockhart, T.H. Claus, S.J. Pilkis, Studies on the phosphorylation of L-type pyruvate kinase by the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase, *J. Biol. Chem.* 255 (1979) 668–675.



- [44] S.K. Moule, J.D. McGivan, Epidermal growth factor stimulates the phosphorylation of pyruvate kinase in freshly isolated rat hepatocytes, *FEBS Lett.* 280 (1991) 37–40.
- [45] P. Presek, M. Reinacher, E. Eigenbrodt, Pyruvate kinase type M<sub>2</sub> is phosphorylated at tyrosine residues in cells transformed by Rous sarcoma virus, *FEBS Lett.* 242 (1988) 194–198.
- [46] T. Hitosugi, S. Kang, M.G. Vander Heiden, T.-W. Chung, S. Elf, K. Lythgoe, S. Dong, S. Lonial, X. Wang, G.C. Chen, J. Xie, T.-L. Gu, R.D. Polakiewicz, J.L. Roesel, T.J. Boggon, F.R. Khuri, D.G. Gilliland, L.C. Cantley, J. Kaufman, J. Chen, Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the Warburg effect and tumor growth, *Sci. Signal.* (2009) ra73.
- [47] P. Presek, H. Glossmann, E. Eigenbrodt, W. Schoner, H. Rübsamen, R.R. Friis, H. Bauer, Similarities between a phosphoprotein (pp 60src)-associated protein kinase of rous sarcoma virus and a cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-independent protein kinase that phosphorylates pyruvate kinase type M<sub>2</sub>, *Cancer Res.* 40 (1980) 1733–1741.
- [48] S. Siwko, D. Mochly-Rosen, Use of a novel method to find substrates of protein kinase C delta identifies M2 pyruvate kinase, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007) 978–985.
- [49] H.R. Christofk, M.G. Vander Heiden, N. Wu, J.M. Asara, L.C. Cantley, Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosin-binding protein, *Nature* 452 (2008) 181–186.





*“Un cuento -al igual que una persona, una mariposa, el huevo de un ave, el corazón humano y los sueños -es algo frágil, pues se compone de elementos tan precarios e insignificantes como son las veintiocho letras del abecedario y unos cuantos signos de puntuación. O de palabras pronunciadas en voz alta, que no son sino sonidos e ideas —cosas abstractas, invisibles, que se desvanecen nada más pronunciarlas—, ¿existe algo más frágil que eso?”*

Neil Gaiman